

Contaminantes ambientales emergentes: Toxicidad del lauril eter sulfato de sodio y el salbutamol sobre larvas de *Rhinella arenarum* y semillas de *Lactuca sativa*.

Fernanda Jimena Vazquez¹, Camila B. Condomiña² y Carolina Aronzon³

Resumen

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos de distinto origen y naturaleza química que en la mayoría de los casos no se encuentran regulados, ni monitoreados. Se ha demostrado que aún a pequeñas concentraciones tienen el potencial de producir efectos tóxicos. Entre los CE encontramos el lauril eter sulfato de sodio (SLES), el cual es un surfactante aniónico muy utilizado en la industria cosmética, farmacéutica, agrícola, de recuperación de petróleo, celulosa o papel, en excavaciones y fabricación de productos de uso doméstico, tecnológico e investigación. Por otro lado, el sulfato de salbutamol es un compuesto farmacológico muy utilizado para el alivio del broncoespasmo entre otros. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad del SLES y salbutamol mediante bioensayos estandarizados de toxicidad con larvas de *Rhinella arenarum* y semillas de *Lactuca sativa*. Este trabajo aporta información novedosa y relevante de la toxicidad de estos CE en dos modelos estandarizados, permitiendo tener un mayor conocimiento sobre los riesgos ambientales que representa.

Palabras claves

Contaminantes Emergentes, Bioensayos de Toxicidad, Larvas de Anfibios, semillas de lechuga.

Abstract

¹ Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA-UBA-CONICET). Centro de Estudios Transdisciplinarios del Agua (CETA-UBA). Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires.

² Universidad de Belgrano, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

³ Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, UNSAM, CONICET, San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina; ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

The emerging pollutants (EC) are compounds of different sources and chemical nature that in most cases are not regulated or monitored. It has been shown that even at small concentrations they have the potential to produce toxic effects. Among the CE we find sodium lauryl ether sulfate (SLES), which is an anionic surfactant widely used in the cosmetic, pharmaceutical, agricultural, oil recovery, cellulose or paper industries, in excavations and in the manufacture of household products, technological and research. On the other hand, salbutamol sulfate is a widely used pharmacological compound for the relief of bronchospasm, among others. The objective of the present work was to evaluate the toxicity of SLES and salbutamol using standardized toxicity bioassays with larvae of *Rhinella arenarum* and seeds of *Lactuca sativa*. This work provides novel and relevant information on the toxicity of these ECs in two standardized models, allowing us to have a better understanding of the environmental risks they represent.

Keywords

Emerging pollutants, Toxicity bioassays, Amphibians larvae, lettuce seeds.

Introducción

Las diversas actividades humanas que diariamente se desarrollan, producen alteraciones en el entorno y en el ambiente. Las actividades industriales, agrícolas y ganaderas, así como aquellas tan comunes como la higiene personal, el cuidado de la salud, entre otros pueden también generar serios problemas ambientales.

Los contaminantes de preocupación emergente corresponden a compuestos de distinto origen y naturaleza química que en la mayoría de los casos no se encuentran regulados, ni monitoreados. Si bien comúnmente se encuentran en el ambiente en concentraciones traza, se ha demostrado que aún a pequeñas concentraciones tienen el potencial de producir efectos tóxicos (Hernando, Mezcuca, Fernández-Alba, & Barceló, 2006), por lo que pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de investigaciones sobre sus potenciales efectos en la biota y en la salud humana. Entre los contaminantes emergentes (CE) encontramos principalmente surfactantes, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, plaguicidas, esteroides, hormonas y subproductos de la desinfección del agua (Sauvé & Desrosiers, 2014).

La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el ambiente para causar efectos negativos debido a su liberación continua (Gracia-Lor,

Martínez, Sancho, Peñuela, & Hernández, 2012). Son de gran interés científico, ya que debido a sus propiedades físico-químicas (alta solubilidad en agua y poco biodegradables), son capaces de alcanzar el medio acuático natural. El nivel de estos compuestos, en el entorno natural, depende entre otras cuestiones de su patrón de consumo y uso, que pueden depender también de hábitos culturales y económicos, aunque tienden a ser similares debido a la globalización de las industrias química y farmacéutica (de García, Pinto, Encina, & Mata, 2013). Por otro lado, las plantas de tratamiento de aguas residuales resultan muchas veces ineficientes, y no logran remover la mayoría de los CE presentes en los efluentes (Hernando et al., 2006).

Argentina no escapa a esta problemática ambiental y en los últimos tiempos se ha informado la presencia de este tipo de contaminantes tanto en cuerpos de agua (Elorriaga, Marino, Carrquiriborde, & Ronco, 2013) como en peces con diferentes hábitos alimenticios (Rojo et al., 2019).

Entre los CE encontramos el lauril eter sulfato de sodio (SLES), el cual es un surfactante aniónico (ANS) derivado del lauril sulfato de sodio, muy utilizado en la industria cosmética, farmacéutica, agrícola de pesticidas, de recuperación de petróleo, celulosa o papel y en la fabricación de productos de uso doméstico y tecnológico. Durante los últimos 50 años, los ANS se han utilizado ampliamente como productos de limpieza debido al cambio del uso de detergentes domésticos en polvo a líquidos sintéticos. La concentración de ANS varía del 3% al 20% en los productos de limpieza y cuidado personal, como detergentes para la ropa y lavavajillas, champú, acondicionadores y jabón líquido, entre otros. Se ha estimado que los ANS representan aproximadamente el 60% de la producción mundial de surfactantes. Si bien las plantas de tratamiento de aguas residuales tienen una alta eficiencia de eliminación (95-99%) debido a su uso difuso y altas tasas de consumo, los surfactantes se podrían encontrar en los ecosistemas acuáticos (Caracciolo, Cardoni, Pescatore, & Patrolecco, 2017). También podrían encontrarse en el suelo, al ingresar a través de biosólidos utilizados como fertilizantes o por irrigación del suelo con agua recuperada, las cuáles podrían tener concentraciones de 120 a 1180 mg/kg (Caracciolo et al., 2017). Además, en la fracturación hidráulica (fracking), se bombea una mezcla de fluidos a los pozos de recuperación a alta presión para fracturar formaciones de baja permeabilidad y así incrementar la producción de gas y petróleo. Los agentes más utilizados son soluciones a base de agua y de ANS, principalmente SLES, generando burbujas que pueden mezclarse con el suelo. La estructura del SLES consiste en una cabeza polar, soluble en agua, y colas no polares, hidrofóbicas, lo cual le confiere propiedades de limpieza o solubilización (Caracciolo et al.,

2017), que podría facilitar el ingreso de compuestos hidrofílicos a los sistemas biológicos por medio de las membranas celulares, alterando también su permeabilidad e integridad.

Si bien los ANS son generalmente considerados biodegradables y no tóxicos, se han informado concentraciones efectivas 50 (CE50) en microalgas marinas, *Isochrysis galbana*, de 24,02 mg/L, y entre 23,92 a 39,24 mg/L para *Artemia franciscana* y *Gammarus pulex*. También se han informado concentraciones letales 50 (CL50) entre 4,2 a 72 mg/L para *Daphnia magna* (Caracciolo et al., 2017).

Por otro lado, el sulfato de salbutamol es un agonista β_2 -adrenérgico de efecto rápido utilizado para el alivio del broncoespasmo, ya que relaja la musculatura lisa bronquial, estimula el movimiento ciliar e inhibe la liberación de mediadores por los mastocitos, evitando de esta manera la respuesta inflamatoria, en padecimientos como el asma y en enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Además, ejecuta una acción vasodilatadora que provoca un efecto cronotrópico reflejo, aumentando la frecuencia cardíaca (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015). Este potencial CE, resulta de sumo interés dado que es un componente activo de un medicamento cuyo uso está aumentando, y aún se desconocen los efectos tóxicos de este compuesto farmacéutico sobre la biota; sin embargo un trabajo reciente muestra que el salbutamol se encuentra en concentraciones de hasta 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el tejido muscular de peces del río Uruguay (Rojo et al., 2019).

La ecotoxicología se define como una ciencia multidisciplinaria que integra la ecología, la química ambiental y la toxicología, y contempla el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes sobre los organismos. Tiene como principal objetivo el desarrollo de protocolos de bioensayos de toxicidad, para ser utilizados como herramientas de predicción temprana, que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, que sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones.

Los anfibios son organismos muy utilizados para estudios ecotoxicológicos, ya que ocupan un lugar estratégico en las tramas tróficas, con formas acuáticas y terrestres; y dado que se reproducen y desarrollan en reservorios de agua están directamente afectados por los contaminantes acuáticos. Asimismo, presentan una alta sensibilidad debido a su ciclo de vida bifásico, alta permeabilidad del tegumento y branquias, y son especialmente sensibles en los estadios temprano del desarrollo (Pérez Coll, Aronzon, & Svartz, 2017). Por otro lado, hace años se viene alertando a nivel mundial acerca de la declinación de las poblaciones de

anfibios y la alta incidencia de malformaciones encontradas en organismos, lo que ha aumentado considerablemente la atención sobre los mismos *Rhinella arenarum*, el “sapo común” americano, es un anfibio del orden anuros, autóctono de Argentina con una amplia distribución en el país (SIB, 2013). Si bien es considerada una especie no amenazada o de preocupación menor (IUCN 2020), hay algunos estudios que alertan sobre su vulnerabilidad frente a la degradación ambiental producto de las diversas actividades humanas (Peltzer et al., 2011). En este contexto surge la importancia de realizar estudios con anfibios, principalmente autóctonos, como *R. arenarum*, durante sus etapas de mayor sensibilidad, evaluando la toxicidad de sustancias, como un modelo para obtener información útil para su protección.

Por otro lado, la lechuga (*Lactuca sativa*) es una hortaliza que ha sido cultivada en la cuenca Mediterránea desde alrededor del año 4500 A.C, es una especie ampliamente utilizada en bioensayos estandarizados. Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la misma, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero & Ronco, 2004). Además, es un organismo muy utilizado en la industria alimenticia y por lo tanto, constantemente cultivada, lo que genera una importancia sobre los suelos en los cuales se cultivan, ya que toda sustancia que sea exógena al mismo podría afectar de alguna forma al crecimiento o su fisiología

Por todo lo mencionado, desde la cátedra de Toxicología ambiental de la Carrera de Ciencias Biológicas y Química de la Universidad de Belgrano, se planteó el objetivo de evaluar la toxicidad de los compuestos emergentes y potencialmente emergente, como ser el SLES y salbutamol, respectivamente, mediante bioensayos estandarizados de toxicidad con semillas de larvas de *Rhinella arenarum* y *Lactuca sativa*.

Materiales y métodos

Bioensayo de toxicidad con *Rhinella arenarum*

Se realizaron bioensayos de toxicidad estandarizados ANFITOX (Pérez Coll et al., 2017), con larvas desde el final del desarrollo embrionario o inicio del desarrollo larval (E.25) (Del Conte & Sirlin, 1951) por un periodo crónico corto de 168h. Las larvas fueron obtenidas por fecundación *in vitro* y fueron donadas por el Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental

(IIIA, UNSAM, CONICET, 3iA). Para ello, se indujo la ovulación de hembras adultas de *R. arenarum* (200-250g) por inyección intraperitoneal de 5000 UI de gonadotrofina coriónica humana (Gonacor®). Luego de 16 a 24h, las hembras comenzaron a ovular. Los oocitos fueron fecundados *in vitro* con un macerado testicular preparado al 10% en una solución fisiológica de mantenimiento para anfibios (Solución ANFITOX, SA) (Pérez Coll et al., 2017).

Los embriones obtenidos fueron mantenidos en SA, asegurando la disponibilidad de oxígeno y medio fresco, hasta su utilización en los bioensayos cuando alcanzaron el estadio del desarrollo adecuado, aproximadamente a los 10 días.

La toxicidad se evaluó por exposición, por duplicado, de grupos de 10 larvas en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro, con 40ml de las diferentes diluciones de los compuestos evaluados en SA y a su respectivo control (SA). En el caso de la exposición al SLES se utilizó un detergente comercial, lauril éter sulfato de sodio (Parafarm droguería saporiti, 25,5% de materia activa, Lote 420795) en un gradiente de diluciones (1/1.10⁶; 1/1.10⁴; 1/2000; 1/1500; 1/1000; 1/500). Para el salbutamol se utilizó una marca comercial del producto farmacéutico (Ventolin®) en un gradiente de concentraciones de 50; 100; 200 y 500 mg/L. Se mantuvo la temperatura constante a 20°± 2° y un fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad. Se evaluaron los efectos letales y se extrajeron los individuos muertos cada 24h.

Las larvas se alimentaron con 3 gránulos de alimento balanceado para peces (TetraColor®) por cápsula cada dos días. En los casos donde fue posible se determinó la CL50 mediante el uso del método de ajuste Spearman-Kärber y se calcularon el LOEC (Menor concentración a la que se observa un efecto, letal en este caso) y NOEC (Mayor concentración a la que no se observa un efecto) de exposición.

Bioensayos de toxicidad con *Lactuca sativa*

Los bioensayos estandarizados con semillas de *L. sativa* se establecieron siguiendo el método propuesto por Sobrero y Ronco (2004). Para lo cual se colocaron 20 semillas comerciales de *L. sativa* de la variedad "criolla" (La Germinadora ®) en cajas Petri de 10 cm de diámetro sobre papel filtro de paso rápido. En cada capsula de Petri se colocaron 3 mL de las diferentes diluciones de los compuestos evaluados y a un control en solución salina suave (SA). En el caso del detergente SLES se realizaron diluciones en SA en una relación 1/1000; 1/500; 1/100; 1/50; 1/25, mientras que para el salbutamol se utilizaron concentraciones de 10; 50; 100; 200 y 500 mg/L. Todos los bioensayos se realizaron por

duplicado. Las capsulas con las semillas se dejaron germinar en oscuridad por 168h, a temperatura ambiente (22°). Transcurrido el tiempo de exposición se contabilizó el número de semillas germinadas y se midió en papel milimetrado bajo lupa estereoscópica la elongación de la radícula e hipocótilo, siendo estos últimos indicadores representativos del desarrollo de la planta, todos los parámetros se compararon con los controles. Para determinar la concentración inhibitoria del 50% (CI50%) se utilizó el software GraphPad Prism 6.

Resultados

Bioensayos de toxicidad con *R. arenarum*

La exposición del SLES produjo efectos letales sobre las larvas de *R. arenarum* desde los primeros minutos de exposición, además presentó una toxicidad tiempo dependiente, dado que se produjo un aumento de la misma con el tiempo de exposición. Se observó a las 72 h una mortalidad del 100% de los individuos a partir de la dilución del SLES de 1/2000. A partir de este dato se pudo calcular el valor NOEC a las 72h, de $1/1 \cdot 10^4$. Los individuos que se encontraban expuestos a la dilución 1/500 se vieron afectados inmediatamente, a los pocos minutos, de la exposición del tóxico, mostrando un elevado grado de sensibilidad ante el mismo. Se pudo establecer una dilución LOEC-144h de $1/1 \cdot 10^6$.

La toxicidad del salbutamol resultó también tiempo dependiente. En la exposición de las larvas de *R. arenarum* se obtuvo una CL50-72h de 149,5 (118,6 -191,6) mg/L mientras que a las 120h la CL50 decreció significativamente a 78,4 mg/L. A las 168h, hubo un 100% de mortalidad a partir de los 100mg/L (Figura 1). El salbutamol también generó efecto subletales sobre las larvas expuestas. Todos los individuos sobrevivientes a 50 mg/L presentaron narcosis, con falta de respuesta a los estímulos. A su vez, los individuos perdieron la pigmentación corporal y sufrieron hidropesía.

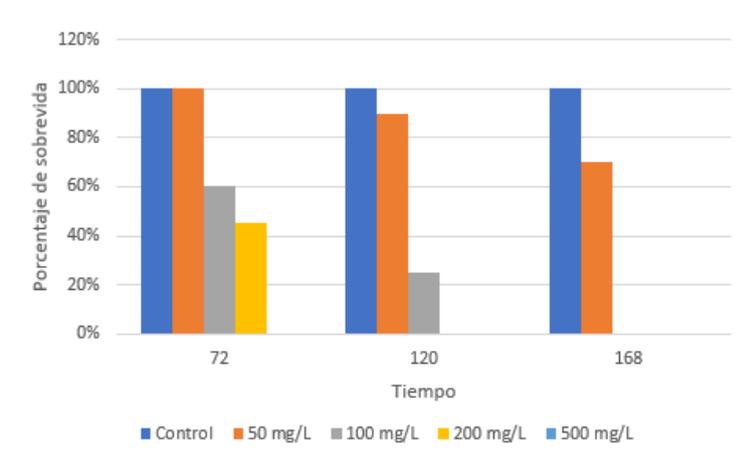


Figura 1: Mortalidad de larvas de *R. arenarum* expuestas al salbutamol a las 72, 120 y 168 h.

Bioensayos de toxicidad con *L. sativa*

Mediante la evaluación de la germinación a las 168h de exposición se pudo obtener una CI₅₀ de 1/300 para la exposición al SLES. A partir de la dilución 1/50 la inhibición fue completa y en 1/100 se pudo observar un agudo efecto inhibitorio. Para el caso del salbutamol se obtuvo una CI₅₀-168h de 250 mg/L.

-Inhibición de los tejidos primordiales.

Por otro lado, en el crecimiento radicular y del hipocótilo de las semillas expuestas, se observó, al igual que en la germinación, una gran inhibición en comparación al control. Para las semillas expuestas al SLES (Figura 2(a)) puede observarse una inhibición en el crecimiento de la radícula, habiendo un abrupto salto de casi un 82% de inhibición a partir de la primera dilución (1/1000) y un 86% en 1/500. Puede observarse a partir de la dilución 1/100 una inhibición del 100% en el crecimiento de la radícula. El mismo patrón pudo observarse en el crecimiento del hipocótilo, observándose una inhibición del 71% en la primera dilución (1/1000) y un 88% en la segunda (1/500). Y a partir de la dilución 1/100 se ve, nuevamente, una total inhibición de los tejidos. Respecto a los efectos sobre el crecimiento de los tejidos primordiales por exposición al salbutamol (Figura 2 (b)), se puede observar que ya a los 10 mg/L hubo una inhibición de crecimiento del 19% del hipocótilo y 43% de la radícula con respecto al control.

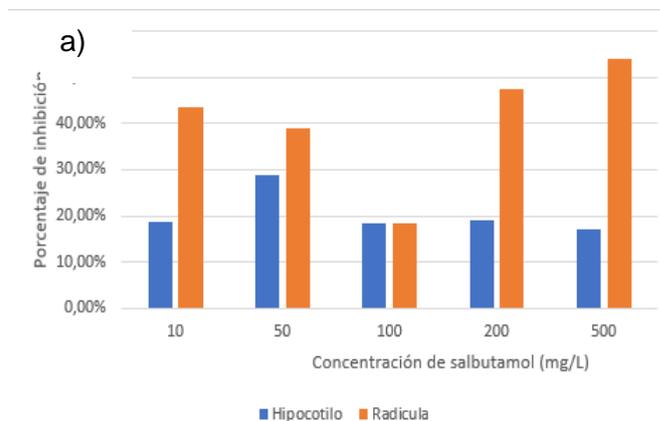
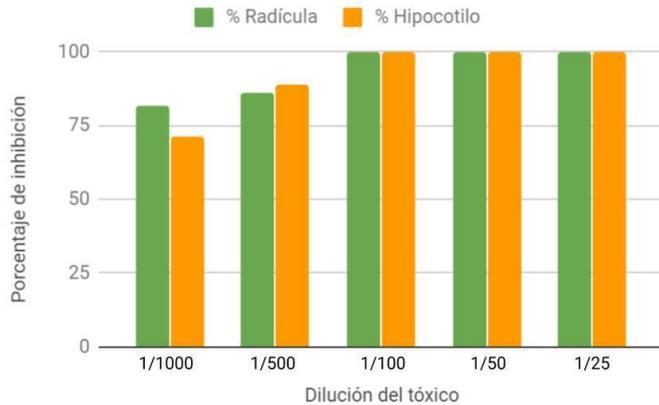


Figura 2: Inhibición b) crecimiento de hipocótilo y radícula en *Lactuca sativa* a las 168 h por exposición (a) al lauril éter sulfato de sodio (SLES) y (b) al salbutamol.

Conclusión

Debido a las grandes cantidades y los amplios usos del SLES, así como el creciente uso del salbutamol, estos contaminantes pueden alcanzar los sistemas naturales, es por ello que resulta relevante el estudio de los efectos tóxicos del mismo sobre la biota, particularmente la autóctona, con fines conservativos.

Los resultados presentados en este trabajo, muestran que el potencial CE salbutamol presenta una toxicidad especie dependiente, siendo las larvas de *R. arenarum* más sensibles al tóxico respecto a las semillas de *L. sativa*, mientras que la CL50-144h para las larvas de anfibio fue de 78,4 mg/L, la CI-50-168h fue de 250 mg/L para la germinación de

las semillas. Esto resalta la importancia de evaluar la toxicidad de los contaminantes en diferentes organismos. Por otro lado, la toxicidad del salbutamol sobre las larvas de *R. arenarum* resultó tiempo dependiente, dado que la misma aumentó significativamente desde las 72h a las 168h de exposición. Esto resalta la importancia de la evaluación de la toxicidad a diferentes tiempos. También se observaron efectos sobre el comportamiento y alteraciones en el desarrollo de las larvas a la concentración más baja ensayada (50 mg/L), que si bien estas alteraciones no afectan directamente la sobrevivencia de los individuos, pueden afectar el *fitness* de los mismos, reduciendo los niveles poblacionales de la especie.

Si bien *L. sativa* mostró una mayor resistencia al salbutamol en la germinación, se pudieron observar efectos en la inhibición del crecimiento a las concentraciones más bajas ensayadas (10mg/L), lo que demuestra que la exposición ambiental al salbutamol podría repercutir en el crecimiento normal de los cultivos.

Por otro lado, la exposición al SLES también resultó especie dependiente, siendo las larvas de *R. arenarum* más sensibles al tóxico respecto a las semillas de *L. sativa*. Esto demuestra que los bioensayos de toxicidad con las larvas de anfibio resulta un modelo más sensible para la exposición de estos CE. Si bien la CL50 de las semillas de *L. sativa* expuestas al SLES fue de 1/300 se pudo observar una inhibición en la germinación a partir de la concentración 1/1000. Más aún, se observó inhibición en el desarrollo de la radícula e hipocótilo, a partir de la dilución 1/1000. Todos los parámetros evaluados en la exposición a ambos contaminantes indican que *L. sativa* es un modelo sensible, tratándose de compuestos fitotóxicos, generadores de crecimiento anormal de las plántulas. Este trabajo deja abierta una línea de investigación de semillas expuestas a sustratos sólidos, particularmente en el caso del SLES, debido a que este tóxico no solo afectaría al agua de los riesgos, sino también al suelo.

R. arenarum también mostró una gran sensibilidad al SLES. Pudo observarse una letalidad instantánea por exposición al SLES a partir de diluciones de 1/2000, un NOEC-72h de 1/1.104y un LOEC-144h de 1/1.106. Si bien, más estudios son necesarios para obtener una CL50, y una mejor comprensión sobre los mecanismos de toxicidad tanto del SLES como del salbutamol sobre estas especies, este trabajo aporta información novedosa y relevante de la toxicidad de estos CE en dos modelos estandarizados, permitiendo tener un mayor conocimiento sobre los riesgos ambientales que representa.

Agradecimientos:

Vazquez, F. J.; Condomiña, C. B.; Aronzon, C. Contaminantes ambientales emergentes: Toxicidad del lauril eter sulfato de sodio y el salbutamol sobre larvas de *Rhinella arenarum* y semillas de *Lactuca sativa*. 116-127.

Este trabajo fue desarrollado en el marco de la materia Toxicología Ambiental de las carraras de Ciencias Biológicas y Químicas de la UB, en base a las propuestas y gracias al esfuerzo de las estudiantes Ornella Tedesco Mercau, Bárbara Morales Groschopp, Celina Beguerie, Ginette Moyano, Carolina Cuesta y Camila B. Condomiña.

Bibliografía

Caracciolo, A. B., Cardoni, M., Pescatore, T., & Patrolecco, L. (2017). Characteristics and environmental fate of the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate (SLES) used as the main component in foaming agents for mechanized tunnelling. *Environmental pollution*, 226(94-103.). doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.008>

de García, S. O., Pinto, G. P., Encina, P. G., & Mata, R. I. (2013). Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Science of the Total Environment*, 444, 451-465.

Del Conte, E., & Sirlin, L. (1951). The first stages of *Bufo arenarum* development. . *Acta Zool Lilloana*, 12, 495-499.

Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2013). Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *International Journal of Environment and Health*, 6(4), 330-339.

Gracia-Lor, E., Martínez, M., Sancho, J. V., Peñuela, G., & Hernández, F. (2012). Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99, 1011-1023.

Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2), 334-342.

Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sanchez, L. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Bionda, C. L., . . . Basso, A. (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations. . *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 432-442.

Pérez Coll, C. S., Aronzon, C. M., & Svartz, G. V. (2017). Developmental stages of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) in toxicity studies: AMPHITOX, a customized laboratory assay *Ecotoxicology and Genotoxicology* (pp. 407-424).

Rojó, M., Álvarez-Muñoz, D., Dománico, A., Foti, R., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Carriquiriborde, P. (2019). Human pharmaceuticals in three major fish species from the

Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental pollution*, 252, 146-154.

Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1-7.

SIB. (2013). Sistema de Información de Biodiversidad. *Rhinella arenarum*-Ficha de la especie.

Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: IMTA.