



TESIS DE MÁSTER

Máster

INGENIERÍA AMBIENTAL

Título

DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA
DE INGREDIENTES UTILIZADOS
EN LOS PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL

Autor

ANA CRISTINA SOLER DE LA VEGA

Tutor

SILVIA DIAZ CRUZ (IDAEA-CSIC)
JOAN DE PABLO RIVAS

Intensificación

QUÍMICA AMBIENTAL

Fecha

JUNIO 2016

Aprobado por:

Dra. M. Silvia Díaz-Cruz
Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Agradecimientos.

Quiero dar las gracias a todos los involucrados para la realización de este trabajo final de master, a mi tutor en la Universitat Politècnica de Catalunya, Joan de Pablo Rivas.

He tenido la oportunidad de trabajar en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), pues hace dos años tenía la idea de realizar mi trabajo en estos renombrados centros de investigación y nunca imagine que fuera hacer una experiencia llena de conocimientos, mucha dedicación y el animarme a seguir en el mundo de la investigación. Agradezco a Daniel Molins-Delgado por su compañerismo, consejos y ayuda.

Quisiera agradecer muy especialmente a la Dra. Silvia Díaz-Cruz por su dedicación, guía y sobre todo paciencia, he de decir que es una fuente de inspiración para mí.



Abstract.

In the last few years, concerns about the environmental fate and behavior of synthetic organic chemicals for hygienic use detected in waters have increased. Several of these compounds are used extensively, in large volumes, are persistent, bioactive and exhibit bioaccumulation and endocrine disrupting activity. Personal care products are widely used by the population. In its composition there is a class of compounds called parabens which is used for its bactericidal property and function of preservatives, and has been identified as potential endocrine disrupters on aquatic biota.

Parabens (alkyl esters of p-hydroxybenzoic acid) are widely used in cosmetics, pharmaceuticals, beverages and foodstuffs as broad-spectrum antimicrobial and antifungal preservatives. Widespread exposure of humans to parabens has raised significant public health concerns. In addition, there is also growing concern about the effects of ultraviolet radiation (UV) in humans and this has caused the increased use of UV filters. The ingredients used in sunscreen products, can be organic compounds such as benzophenones (BP), or inorganic micro-pigments such as titanium dioxide (TiO₂), which ultimately these nanoparticles reach aquatic ecosystems, where their behavior and harmful effects have hardly been studied.

A lack of information still exists regarding the potential impact associated with the occurrence, fate and ecotoxicological effects of endocrine disruptors, including personal care compounds in the environment since few compounds were inventoried or regulated worldwide as regards their environmental impact. In some cases, there are no legal requirements to assess the effects of long-term exposure to low concentration of these chemicals (chronic toxicity).

In this work we studied the toxicity in *Daphnia magna* and marine algae *Phaeodactylum tricornutum*, with different compounds used in personal care products. Some experiments were conducted with mixtures of these compounds as well in *Daphnia magna* and the results showed that the mortality increase in proportion to the concentration of the elements present in the mixture. These results emphasize the relevance of the research on the toxicity of compounds mixtures in aquatic biota.

Resumen.

En los últimos años, la preocupación por el destino y el comportamiento de gran número de sustancias químicas orgánicas sintéticas para uso en productos de cuidado e higiene personal detectados en aguas medioambientales, ha ido en aumento. Varios de estos compuestos se utilizan extensamente en grandes cantidades, y se sabe que muchos de ellos son persistentes en el medio ambiente, bioacumulables, bioactivos, además de exhibir actividad de alteración endocrina. Los productos de cuidado personal son ampliamente utilizados por la población. En su composición hay un tipo de compuestos llamados parabenos, que se utilizan por sus propiedades bactericidas y fungicidas como conservantes. Estos compuestos se han identificado como posibles disruptores endocrinos en biota acuática.

Los parabenos, (ésteres de alquilo del ácido p-hidroxibenzoico) son ampliamente utilizados en cosméticos, productos farmacéuticos, bebidas y alimentos actuando como un antibiótico de amplio espectro. En base a estos conocimientos, la exposición del medio ambiente acuático a los parabenos ha planteado una importante preocupación, más allá de la preocupación por la salud humana. Pese a todo ello, los parabenos se siguen utilizando frecuentemente y actualmente todavía se sabe poco acerca de la presencia, destino y efectos de los parabenos en el medio ambiente.

Desde hace algunos años, también existe una creciente preocupación por los efectos de la radiación ultravioleta (UV) en los seres humanos, como melanomas y envejecimiento cutáneo. Como consecuencia, el aumento del uso de productos que contienen filtros UV ha sido exponencial. Los ingredientes utilizados en productos de protección solar, pueden ser compuestos orgánicos como las benzofenonas (BP), o micropigmentos inorgánicos como el dióxido de titanio (TiO_2). En última instancia estas nanopartículas llegan a los ecosistemas acuáticos, donde su comportamiento y efectos apenas se han estudiado.

Todavía no existe suficiente información acerca de su presencia, destino y efectos ecotóxicos y disrupción endocrina en el medio ambiente y en los humanos. Estos compuestos no están regulados en el medio ambiente, es decir, no se les controla y tampoco existen requisitos legales para evaluar el impacto de la exposición a largo plazo a la baja concentración de estas sustancias químicas (toxicidad crónica).

En este trabajo se estudió la toxicidad de diferentes compuestos presentes en productos de cuidado personal utilizando el crustáceo planctónico *Daphnia magna* y la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum*,. Algunos experimentos se llevaron a cabo con mezclas de estos compuestos, y los resultados mostraron que la mortalidad de la *Daphnia magna* va en aumento en proporción a la concentración de los elementos presentes en la mezclas. Estos resultados ponen de relieve la importancia de la investigación sobre la toxicidad de ciertas sustancias y sus mezclas en la biota acuática.

Índice

1. Introducción	1
2. Productos de Cuidado Personal.	4
2.1. Productos de Cuidado Personal y medio ambiente.	4
2.1.1. Procesos de bioacumulación y biomagnificación.	5
2.2. Uso de Productos de Cuidado Personal.	5
2.3. Ingredientes de los Productos de Cuidado Personal.	8
3. Filtros UV	13
3.1. Tipos de filtros UV.....	13
3.1.1. Filtros inorgánicos (físicos).	13
3.1.2. Filtros orgánicos (químicos).	17
4. Conservantes	24
4.1. Parabenos.....	26
5. Normativa	29
6. Objetivos	33
6.1. Objetivo general.....	33
6.2. Objetivos específicos.	33
7. Material y método	34
7.1. Estudios de toxicidad con <i>Daphnia magna</i>	34
7.1.1. Preparación del medio de incubación.	34
7.1.2. Eclosión de los efipios o <i>Daphnia magna</i>	35
7.1.3. Bioensayos.	36
7.2. Estudios de la toxicidad con la alga marina <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	39
7.2.1. Preparación del medio de cultivo para el alga.	39
7.2.2. Cultivo de la alga <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	39
7.2.3. Bioensayos.	40
7.2.4. Preparación de las diluciones.	41
7.2.5. Incubación de las celdas.....	42
8. Tratamiento de los datos	43
8.1. Para <i>Daphnia magna</i>	43
8.2. Para la alga marina <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	44
9. Resultados y discusión	45
9.1. Estudios de Toxicidad aguda para <i>Daphnia magna</i>	45

9.2. Estudios de Toxicidad aguda para <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	49
9.3. Estudios de Toxicidad con <i>Daphnia magna</i> para mezclas binarias.	52
10. Conclusiones.	54
11. Referencias Bibliográficas.	56
12. Anexos.	63

Lista de Figuras

Figura 1: Tendencia del mercado de PCP en Estados Unidos	6
Figura 2: Valor de las ventas de los productos de belleza y cuidado personal en España entre 2013 y 2014, por categoría en millones de euros.	7
Figura 3: Partículas de nano dióxido de titanio.	15
Figura 4: Estructura química general de un parabeno, donde R corresponde a un grupo alquilo.	17
Figura 5: Necesidad de conservante en los productos de cuidado personal (Fuente www.cosmeticinfo.org).....	25
Figura 6: Estructura química general de un parabeno, donde R corresponde a un grupo alquilo.	26
Figura 7: <i>Daphnia magna</i> en placas Petri.....	35
Figura 8: Cubetas para bioensayos de Toxicidad con <i>Daphnia magna</i>	37
Figura 9: Conteo de organismos inhibidos.....	37
Figura 10: Lectura de la densidad óptica (DO).	41
Figura 11: Resultados de Toxicidad para 24, 48 y 72 h de exposición a los compuestos: TiO ₂ (a), MeP (b), PrP (c) y BzP (d) en <i>Daphnia magna</i>	47
Figura 12: Resultados de Toxicidad para 24, 48 y 72 h para TiO ₂ (a) y para BzP (b).....	51
Figura 13: Mezcla TiO ₂ .BzP y % inhibición la mezcla (a), mezcla TiO ₂ .BP3 y % inhibición de la mezcla (b) y mezcla de BzP-BP3 y % inhibición de la mezcla (c).....	53

Lista de Tablas

Tabla 1: PCPs más importantes divididos en categorías.	9
Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos más importantes de la familia de filtros solares.	19
Tabla 3: Características fisicoquímicas de los parabenos. Kow: coeficiente de partición octanol-agua....	28
Tabla 4 Anexo IV Filtros solares UV permitidos en la UE (CPR, EC/1223/2009).....	30
Tabla 5: Valor de EC50 de los compuestos estudiados en diferentes tiempos de exposición.....	46
Tabla 6: EC ₅₀ de TiO ₂ y BzP estudiados en 24, 48 y 72 h.	50

1. Introducción

Los Productos de Cuidado Personal (PCPs) considerados como contaminantes emergentes (CE), son fundamentalmente nuevas sustancias que han sido liberados en el medio ambiente durante las últimas décadas debido a los cambios en la estructura socio-económica de la sociedad.

Debido a su liberación continua en el medio ambiente sus efectos han sido probados (sobre todo en ensayos in vitro e in vivo), como una amenaza para todo tipo de organismos vivos. Estudios recientes sugieren que la aplicación continua sobre la piel o la ingesta de alimentos contaminados pueden causar efectos de riesgo en seres humanos¹.

Varios estudios datan que estos contaminantes presentan efectos significativos alterando al sistema endocrino y bloqueando o perturbando las funciones hormonales, afectan la salud de los seres humanos y de especies animales aun cuando se encuentran en tan bajas concentraciones².

Como son liberados en forma rutinaria en altas cantidades, estos compuestos pueden ser un potencial riesgo para el medioambiente pues son de baja biodegradabilidad, su seguimiento rara vez se incluye en la legislación ambiental alrededor del mundo y su destino es en su mayoría desconocido, para la mayoría de ellos¹.

Los PCPs son continuamente introducidos en el compartimento de agua natural, principalmente a través de las aguas residuales tratadas y no tratadas, pero también a través de diferentes vías, y por esto que la calidad del medio acuático depende profundamente tanto de procesos naturales como de actividades antropogénicas¹.

A lo anterior se puede agregar que el rápido desarrollo humano e industrial ha hecho que durante décadas las aguas superficiales sean receptoras de multitud de estas sustancias contaminantes. A este problema de deterioro de la calidad del agua cabe añadir su escasez, agravada por las consecuencias del cambio climático y la desertización³.

En los últimos años, la normativa en materia de contaminación y calidad de aguas ha permitido controlar y mejorar la descarga de sustancias contaminantes “convencionales” (nitratos, fosfatos, sulfatos, cloruros, etc.) en las aguas continentales.

Sin embargo, el continuo descubrimiento de nuevos contaminantes no regulados y potencialmente peligrosos, llamados “contaminantes emergentes”, pone de manifiesto la necesidad de investigar sobre su presencia y sus niveles de concentración en las aguas⁴.

La mayoría de estas sustancias, ya sea en su forma original o su forma biológicamente alterada (metabolitos), son descargadas en las aguas residuales y conducidos a las ETAR, en las cuales pueden sufrir mineralización (conversión de la materia orgánica en dióxido de carbono y agua), ser biodegradados o no sufrir ninguna transformación luego de los diferentes procesos de purificación. En este sentido, muchos PCP han sido detectados frecuentemente en aguas superficiales a niveles incluso mayores de 1 mg/L⁵.

En general, el uso continuo y generalizado de PCP ha traído como consecuencia la liberación de grandes cantidades de sustancias químicas al medio ambiente, comprobándose su presencia en efluentes de aguas residuales, aguas superficiales e incluso aguas potables⁴.

A lo anterior debemos el creciente interés por los CE, ya que son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medioambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran medida inadvertidas, pudiendo causar problemas ambientales y de riesgo para la salud del medio ambiente y de los humanos⁶.

Estos compuestos se encuentran distribuidos en el medio ambiente y se han detectado en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potable⁷. Son compuestos que pueden ser candidatos a legislación futura, dependiendo de las investigaciones sobre sus efectos en la salud y las concentraciones ambientales a las que se encuentren; por lo tanto, son susceptibles a una exhaustiva investigación⁸.

Los Productos de Cuidado Personal (de ahora en adelante, PCPs), se encuentran entre los principales ejemplos de contaminantes emergentes y muchos de ellos se ha demostrado que son disruptores endocrinos, que son sustancias de origen natural o antropogénico que causan alteraciones en el correcto funcionamiento del sistema endocrino del organismo con posibles

efectos adversos sobre el desarrollo y la reproducción, daños neurológicos y problemas inmunológicos (Compuestos Endocrinos Disruptores, CED)⁹.

Además, los PCPs se consideran persistentes en el medio ambiente porque se introducen continuamente en él, son bioactivos, y se acumulan en fango de depuradora y sedimentos, y se bioacumulan en humanos¹⁰, además de provocar diversas respuestas fisiológicas adversas en los organismos acuáticos¹¹.

Estudios en seres humanos indican que los parabenos se pueden acumular en el estrato córneo (la capa externa protectora de la piel) durante el período de un mes y que los niveles de parabenos en el cuerpo aumentan después de la aplicación tópica¹², de igual manera en estudios pasados se ha demostrado actividad disruptora endocrina en organismo por el uso de algunos filtros UV¹³.

2. Productos de Cuidado Personal.

En este apartado se describen los principales aspectos relacionados con la existencia e impacto en el medio ambiente de los ingredientes contenidos en los Productos de Cuidado Personal.

2.1. Productos de Cuidado Personal y medio ambiente.

Los Productos de Cuidado Personal (PCPs), son de gran interés científico, ya que sus emisiones en el medio ambiente puede aumentar la presencia de bacterias resistentes¹⁴, además debido a sus propiedades físico-químicas (alta solubilidad en agua y poco biodegradable) son capaces de llegar a cualquier medio natural y representar un grave riesgo para el consumo de agua potable¹⁵.

Este tipo de compuestos son considerados como contaminantes persistentes, ya que se liberan de forma continua en los ecosistemas acuáticos a través de dos vías; insumos directos como consecuencia de la utilización de agua para distintos procesos y los insumos indirectos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR's) como resultado del uso interno de estos productos así como de los residuos industriales¹⁵, donde una parte de estos compuesto será eliminada, mientras que la porción restante será devuelta al medio ambiente a través de la descarga de las aguas ya tratadas¹⁶.

Algunas sustancias de estas sustancias que son excretadas no son únicamente hidrofílicas sino también lipofílicas, y son capaces de sufrir una descomposición metabólica y una rápida eliminación, siendo esto más difícil su estudio, determinar la tasa de acumulación y conocer su destino. Además de lo anterior, la variación de la temperatura puede alterar los procesos de degradación e incrementar la disponibilidad de los contaminantes¹.

2.1.1. Procesos de bioacumulación y biomagnificación.

Varios autores definen bioacumulación como la captación o adsorción de una sustancia desde el medio ambiente, su acumulación en el tiempo, y su retención en un organismo vivo^{1, 17}. El factor de bioacumulación se calcula como la relación entre la concentración del contaminante en la muestra de biota y la concentración de ese contaminante en el medio ambiente que la rodea (agua, sedimento)¹⁸.

Con el fin de evaluar este fenómeno, es esencial una determinación precisa de las propiedades de los compuestos orgánicos para conocer su hidrofobicidad y por lo tanto su potencial de bioacumulación. No obstante, en algunos casos es difícil conocer o calcular el coeficiente de partición octanol-agua de las sustancias (debido a datos pobres y escasos)¹⁹.

Por lo tanto, los modelos de bioacumulación son difíciles de elaborar y por tanto no existen para la mayoría de compuestos químicos²⁰. Un proceso asociado a la bioacumulación es la biomagnificación. Biomagnificación es el proceso en el que una sustancia presente en el medio ambiente se transfiere a través de la red trófica, de organismo a organismo, siendo mayor su concentración en un organismo superior de la cadena trófica (mayor que la de su fuente de alimento).

Longevidad y tamaño del organismo, son factores que podrían contribuir a un mayor nivel de contaminantes en los niveles tróficos superiores²¹. Este fenómeno ha sido ya descrito para algunos productos químicos hidrofóbicos y recalcitrantes en pescado²²⁻²³.

2.2. Uso de Productos de Cuidado Personal.

Los PCPs son producidos para uso directo sobre el cuerpo humano. En general estos productos están dirigidos a modificar el olor, el aspecto o el tacto de la piel. Muchos de estos productos son usados como ingredientes activos o conservantes en cosméticos, productos de baño o fragancias.

El mercado de ingredientes en la industria de la cosmética/cuidado personal está creciendo a un ritmo impresionante. Este mercado, solamente en Estados Unidos (USA) facturó 7.46 billones de dólares en 2014, pero se estima que alcanzará los 11.46 billones de dólares en 2023, con un crecimiento anual del 5.2%.

En la Figura 1 se muestra la tendencia de mercado de los Productos de Cuidado Personal en USA.

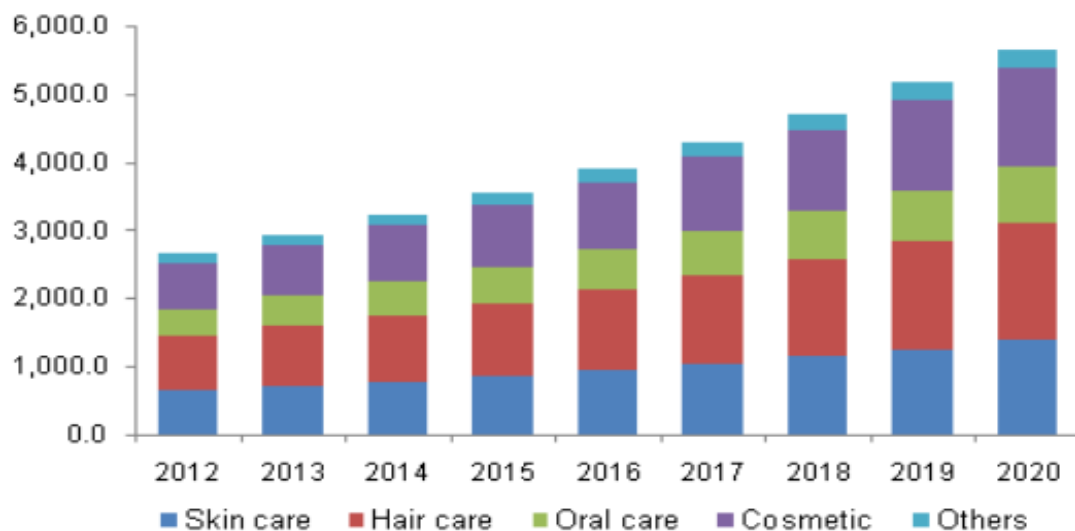


Figura 1. Tendencia del mercado de PCP en Estados Unidos⁵⁵.

En Europa (UE) el mercado de los ingredientes utilizados en los PCPs, superó los 2.400 millones de dólares en dos años, de 2012 a 2014. De las cinco grandes categorías en las que podemos tipificar el sector, en 2014, los productos para el cuidado de la piel y cosméticos son los más demandados, con un peso en el mercado del 28% y 25%, respectivamente.

Más de 5 millones de artículos de higiene personal y cosméticos se venden anualmente en el continente Europeo. Alemania, Francia y el Reino Unido lideran el listado de países compradores de este tipo de productos.

Es importante resaltar que en la UE la industria de cosméticos cubre desde grandes conglomerados de fabricantes internacionales hasta pequeñas empresas familiares que operan en nichos específicos de mercado. En 2011, el empleo generado por el sector que integra más de 4.000 empresas, fue de aproximadamente 1,7 millones de personas.

Básicamente los ingredientes destinados a los PCPs se clasifican en siete categorías: surfactantes (los cuales suponen más del 30% de la cuota del mercado mundial de cuidado personal en 2014), polímeros acondicionadores, emolientes, agentes de control reológicos, emulsionantes, antimicrobianos, y otros (absorbentes de UV y polímeros fijadores del cabello).

A continuación en la Figura 2 se muestra las ventas de productos por categoría en España entre 2013 y 2014.

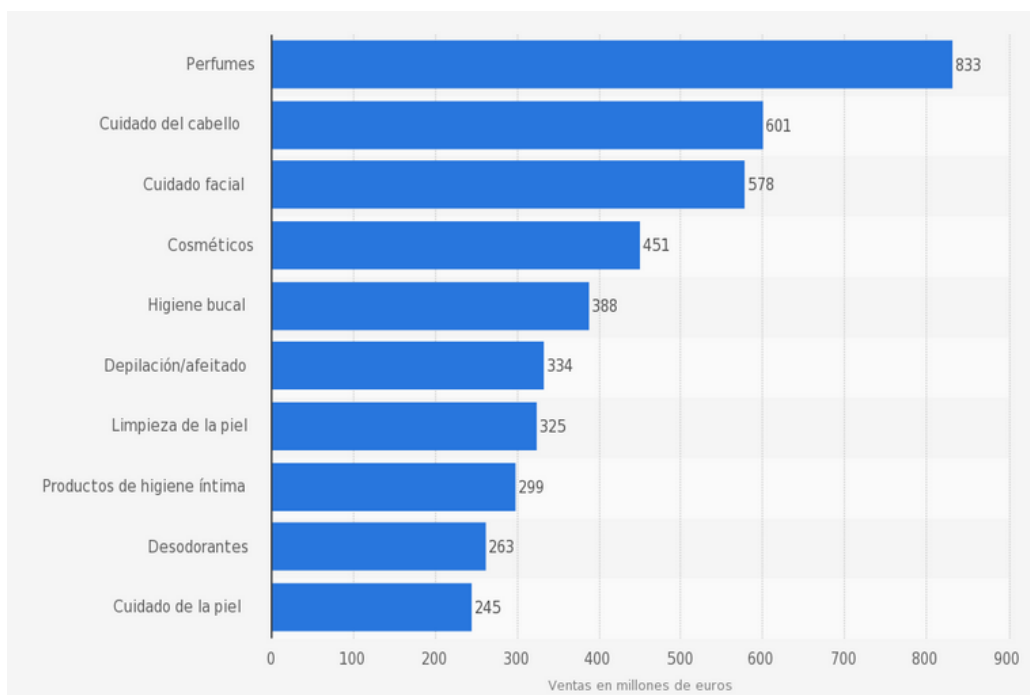


Figura 2: Valor de las ventas de los productos de belleza y cuidado personal en España entre 2013 y 2014, por categoría en millones de euros⁵⁵.

La estadística anterior (Figura 2), muestra el desglose de la facturación de los productos de belleza y cuidado personal en España durante el año 2013 y 2014, durante este período se facturó 6.450 millones de euros.

También en Asia Pacífico el 2014 fue un año de grandes ventas de ingredientes de cuidado personal, principalmente debido al alto consumo en China y la India. En los próximos años se espera que en esta zona se siga ampliando el mercado de manera significativa.

En particular, se espera, por ejemplo, que el dióxido de titanio en el mercado de la cosmética, que ya mueve miles de toneladas²⁴, tendrá un enorme aumento de la demanda hasta 2019, con una tasa de crecimiento anual del 12%. Las nanopartículas a base de titanio se utilizan en productos de protección solar y cosmética para mejorar la consistencia y el espesor, este material se ha convertido en una tendencia entre los productores de cosméticos desde 2010, estimulando gran demanda de dióxido de titanio en el mercado global²⁴.

2.3. Ingredientes de los Productos de Cuidado Personal.

Los PCPs es un término genérico que describe un grupo de compuestos químicos orgánicos incluidos en diferentes productos ampliamente utilizados en la vida diaria en humanos (tales como pasta de dientes, champú, cosméticos e incluso en los alimentos), que se utilizan en cantidades considerables²⁵.

Después de su uso, pueden ser absorbidos por el cuerpo, se excretan o se lavan después de su aplicación. Muchos de los ingredientes que se utilizan para la fabricación de los PCPs son consumidos en grandes cantidades²⁶.

Los ingredientes de los PCPs pueden ser ordenados según las siguientes categorías principales: filtros UV (filtros solares), biocidas (antimicrobianos), conservantes, fragancias, repelentes de insectos, aditivos y detergentes, como se observa en la Tabla 1.

En este estudio centraremos la atención en los conservantes en especial en 3 de la familia de los parabenos, metilparabeno (MeP), propilparabeno (PrP) y bencilparabeno (BzP), y a los filtros UV, uno de ellos orgánico benzofenona-3 (BP3) y el otro inorgánico, dióxido de titanio (TiO₂) y que más adelante se explicarán.

Tabla 1. PCPs más importantes divididos en categorías.

Name	INCI	Abbreviation	CAS	Function	Max. Concentration allowed according to Regulation 1223/2009/EC
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	BENZOPHENONE 3	BP3	131-57-7	UV filter	10%
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid	BENZOPHENONE 4	BP4	4065-45-6	UV filter	5%
3-(4-Methylbenzylidene)-d1 camphor	4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR	4MBC	36861-47-9	UV filter	4%
2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate	ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE	EHMC	5466-77-3	UV filter	10%
2-Cyano-3,3-diphenyl acrylic acid, 2- ethylhexyl ester/	OCTOCRYLENE	OC	6197-30-4	UV filter	10%
2-Ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate	ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA	OD-PABA	21245-02-3	UV filter	8%
Benzyl 2-hydroxybenzoate	BENZYL SALICYLATE	BZS	118-58-1	UV filter	0,001 % in leave-on products — 0,01 % in rinse-off products
2-Ethylhexyl salicylate/Octisalate	ETHYLHEXYL SALICYLATE	OS	118-60-5	UV filter	5%
Benzoic acid, 2-hydroxy-, 3,3,5- trimethylcyclohexyl ester	HOMOSALATE	HMS	118-56-9	UV filter	10
2-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol	BUMETRIZOLE	UV326	3896-11-5	UV filter	No data available
2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-p-cresol	DROMETRIZOLE	UVP	2440-22-4	UV filter	No data available
3,3'-(1,4-Phenylenedimethylene) bis(7, 7-dimethyl-2-oxobicyclo- [2.2.1]hept-1-yl-methanesulfonic acid) and its salts/Ecamsule	TEREPHTHALYLIDENE DICAMPHOR SULFONIC ACID	TDSA	92761-26-7	Biocide	10%
Phenol,2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4- methyl-6-(2-methyl-3-(1,3,3,3-tetramethyl-1-(trimethylsilyl)oxy)-disiloxanyl)propyl)	DROMETRIZOLE TRISILOXANE	DTS	155633-54-8	Biocide	15%
Benzoic acid, 4,4-((6-((4-(((1,1-dimethylethyl)amino)carbonyl)phenyl)amino)-1,3,5-triazine-2,4- diyl)diimino)bis-, bis (2-ethylhexyl) ester	DIETHYLHEXYL BUTAMIDO TRIAZONE	DEBT	154702-15-5	Biocide	10%
2,2'-Methylene-bis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethyl- butyl)phenol)	METHYLENE BIS-BENZOTRIAZOLYL TETRAMETHYLBUTYLPHENOL	MBBT	103597-45-1	Biocide	10%

2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid and its potassium, sodium and triethanolamine salts/ 2,4,6-Trianiino-(p-carbo-2'- ethylhexyl-1'-oxy)-1,3,5-triazine	PHENYLBENZIMIDAZOLE SULFONIC ACID	PBSA	27503-81-7	Biocide	8%
	ETHYLHEXYL TRIAZONE	EHT	88122-99-0	Biocide	5%
2,2'-(6-(4-Methoxyphenyl)-1,3,5- triazine-2,4-diyl)bis(5-(2-ethylhexyl)oxy)phenol)	BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE	BEMT	187393-00-6	Biocide	10%
1-(4-tert-Butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione/ Avobenzone	BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE	BMBM	70356-09-1	Biocide	5%
1H-Benzotriazole	BENZOTRIAZOLE	BZT	95-14-7	Biocide	No data available
5-Chloro-2- (2,4- dichlorophenoxy) phenol	TRICLOSAN	TCS	3380-34-5	Biocide	0%
1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4- dichlorophenyl) urea	TRICLOCARBAN	TCC	101-20-2	Biocide	0.2%
					leave-on products: 0,1 % except: hydroalcoholic products: 1 % fine fragrance: 2,5 % fragrance cream: 0,5 % (b) rinse-off products: 0,2 %
1-(5,6,7,8- Tetrahydro- 3,5,5,6,8,8,- hexamethyl-2-naphthyl)ethan- 1-one	ACETYL HEXAMETHYL TETRALIN	AHTN	1506-02-1	Fragrance	
1,1,2,3,3,6- Hexamethylindan-5-yl methyl ketone	ACETYL HEXAMETHYL INDAN	AHDI	15323-35-0	Fragrance	2%
1, 3, 4, 6, 7, 8- hexahydro- 4, 6, 6, 7, 8, 8- hexamethylindeno[5, 6- c]pyran	HEXAMETHYLINDANOPYRAN	HHCB	1222-05-5	Fragrance	No data available
1-(1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-2,3,8,8,-tetramethyl-2-naphthyl)ethan-1-one	TETRAMETHYL ACETYLOCTAHYDRONAPHTHALENE S	OTNE	54464-57-2	Fragrance	No data available
5-tert-Butyl- 2,4,6-trinitro- m-xylene	MUSK XYLENE		81-15-2	Fragrance	a) 1,0 % in fine fragrance (b) 0,4 % in eau de toilette (c) 0,03 % in other products
4'-tert-Butyl- 2',6'-dimethyl- 3',5'-dinitroacetophenone	MUSK KETONE		81-14-1	Fragrance	(a) 1,4 % in fine fragrance (b) 0,56 % in eau de toilette (c) 0,042 % in other products

2-Phenoxyethanol	PHENOXYETHANOL	2-PE	122-99-6	Preservative	1%
Methyl p-hydroxybenzoate	METHYL PARABENE	MeP	99-76-3	Preservative	0,4 % (as acid) for single ester, 0,8 % (as acid) for mixtures of esters
Ethyl p-hydroxybenzoate	ETHYL PARABENE	EtP	120-47-8	Preservative	0,4 % (as acid) for single ester, 0,8 % (as acid) for mixtures of esters
n-Propyl p-hydroxybenzoate	N-PROPYL PARABENE	n-PrP	94-13-3	Preservative	0,4 % (as acid) for single ester, 0,8 % (as acid) for mixtures of esters
Isopropyl p-hydroxybenzoate	I-PROPYL PARABENE	i-PrP	4191-73-5	Preservative	0,4 % (as acid) for single ester, 0,8 % (as acid) for mixtures of esters
n-Butyl p-hydroxybenzoate	N-BUTYL PARABENE	n-BuP	94-26-8	Preservative	0,4 % (as acid) for single ester, 0,8 % (as acid) for mixtures of esters
Isobutyl p-hydroxybenzoate	I-BUTYL PARABENE	i-BuP	4247-002-3	Preservative	0,4 % (as acid) for single ester, 0,8 % (as acid) for mixtures of esters
Nonylphenol	NONYLPHENOL	NP	25154-52-3	Surfactant	Prohibited
Dibutyl Phthalate	DIBUTYL PHTHALATE	DBP	84-74-2	Surfactant	Prohibited
Diisopentyl phthalate	DIISOPENTHYL PHTHALATE	DIIP	605-50-5	Surfactant	Prohibited
N,N-diethyl-meta-toluamide	DIETHYL TOLUAMIDE	DEET	134-62-3	Insect Repellent	No data available
1-Piperidinecarboxylic acid	HYDROXYETHYL ISOBUTYL PIPERIDINE CARBOXYLATE		119515-38-7	Insect Repellent	No data available
Octamethylcyclotetrasiloxane	CYCLOTETRASILOXANE	D4	556-67-2	Additives	No data available
decamethylcyclopentasiloxane	CYCLOPENTASILOXANE	D5	541-02-6	Additives	No data available

dodecamethylcyclohexasiloxane	CYCLOHEXASILOXANE	D6	540-97-6	Additives	No data available
tetradecamethylcycloheptasiloxane	CYCLOHEPTASILOXANE	D7	107-50-6	Additives	No data available

3. Filtros UV.

Los Filtros UV constituyen un grupo heterogéneo de productos químicos utilizados como protección contra los efectos nocivos de la radiación solar UV, éstos son utilizados en una amplia variedad de PCPs tales como lociones, champús o cremas²⁵, son capaces de prevenir el fotoenvejecimiento, la fotocarcinogenesis y la fotoinmunosupresión²⁷⁻²⁹.

Estos compuestos mayoritariamente lipofílicos, los encontramos en diversos ámbitos de producción, siendo utilizada en pintura para la protección de la coloración de los pigmentos, en la fabricación de plásticos, en tintas, en aplicaciones fotográficas, textiles y en casi cualquier producto cosmético. Tras su uso, estos compuestos pueden ser absorbidos por el organismo después de su aplicación, para ser posteriormente excretados eliminados con el lavado.

3.1. Tipos de filtros UV.

Los filtros UV se dividen en dos grandes grupos teniendo en cuenta su naturaleza química: filtros inorgánicos y filtros orgánicos cada uno de ellos se explicará a continuación.

3.1.1. Filtros inorgánicos (físicos).

Son los protectores solares minerales que reflejan/bloquean la radiación UV a través de su reflexión y propiedades de dispersión. Compuestos metal-óxido se pueden encontrar fácilmente en los protectores solares, polvos y sombras de ojos. En la normativa europea sólo el óxido de titanio (TiO_2) está aceptado para productos cosméticos, aunque otros como alúmina, cerio y circonita también se utilizan en otro tipo de productos³⁰. Cabe señalar que el uso de las nanopartículas de TiO_2 es cada vez más frecuente en los filtros solares.

3.1.1.1. Nanomateriales como filtros UV inorgánicos.

Debido a que muchos tipos de nanomateriales se fabrican y liberan al ambiente a escala industrial, entre la comunidad científica hay una preocupación creciente por sus efectos en la salud humana y en el medioambiente³¹. La escala nanométrica corresponde a longitudes entre 1 y 100 nanómetros (nm), donde 1 nm corresponde a aquella parte que resulta de dividir un metro lineal en mil millones de partes. Los objetos que se encuentran en esta escala y cuyas dimensiones se hayan entre 1 y 100 nm se consideran nanomateriales.

A escala nanométrica las moléculas tienen propiedades novedosas y atractivas en numerosas industrias (electrónica, biofarmacia, medicina, mecánica, cosmética, textil o robótica, por mencionar algunas). Los materiales adquieren características que los hacen más fuertes, ligeros, más resistentes al calor o mejores conductores de electricidad, pero al mismo tiempo pueden ser más tóxicos.

Existen tres categorías en las cuales se están empleando nanomateriales, estos son: productos de cuidado personal, alimentos y suplementos alimenticios. En la categoría de alimentos en algunos aderezos para ensaladas y algunos untables contienen compuestos a nanoescala con el fin de retardar la separación de los componentes; algunas verduras y frutas pueden contener cubiertas comestibles con algunos nanomateriales para proteger al producto y extender su vida útil.

También el uso de nanomateriales en envases para bebidas, donde las botellas de plástico compuesto contienen nanopartículas de arcilla, que permite mejorar la propiedad barrera de la botella y extender la vida útil de las bebidas.

El creciente uso de nanomateriales en una amplia gama de productos de consumo ha llevado a plantear la seguridad de varias sustancias, entre ellas el dióxido de titanio (TiO_2). Este compuesto en forma de nanopartículas se utiliza como decolorante en cremas y lociones, y actualmente está aprobado como filtro UV para protectores solares³².

El TiO_2 y el óxido de zinc (ZnO) son materiales presentes en la naturaleza y son utilizados muy comúnmente en protectores solares por su capacidad de reflejar y absorber la luz UV y así proteger la piel humana contra los daños de la radiación UV. En las lociones solares el dióxido de titanio está presente en clúster cuya medida es más grande de 100 nm para así asegurar la óptima protección de la piel.

Estos dos nanomateriales antes mencionados, hoy en día, ambas clases de productos químicos se consideran contaminantes emergentes³³.

Las implicaciones ambientales en relación con tal toxicidad y con la biodegradabilidad de las nanopartículas y los efectos de éstas en la salud de la diversidad de especies (incluyendo la humana), en el corto y en el medio plazo, son de consideración puesto que se estima que podrían interferir en las funciones vitales³⁴. La bioacumulación y persistencia de las nanopartículas a lo largo de la cadena alimentaria es también un factor a tener en cuenta³⁵.

3.1.1.2. Dióxido de Titanio

El TiO_2 es un compuesto químico ampliamente utilizado en muchos productos comerciales (pinturas, cosméticos, plásticos, papel, comida). Como curiosidad merece la pena mencionar un reciente estudio, sobre nanopartículas de TiO_2 (TiO_2NP_s) en productos de alimentación y de higiene personal que revela que el 36% de los productos analizados contenían partículas de TiO_2 de un tamaño $<100\text{ nm}$ ³².

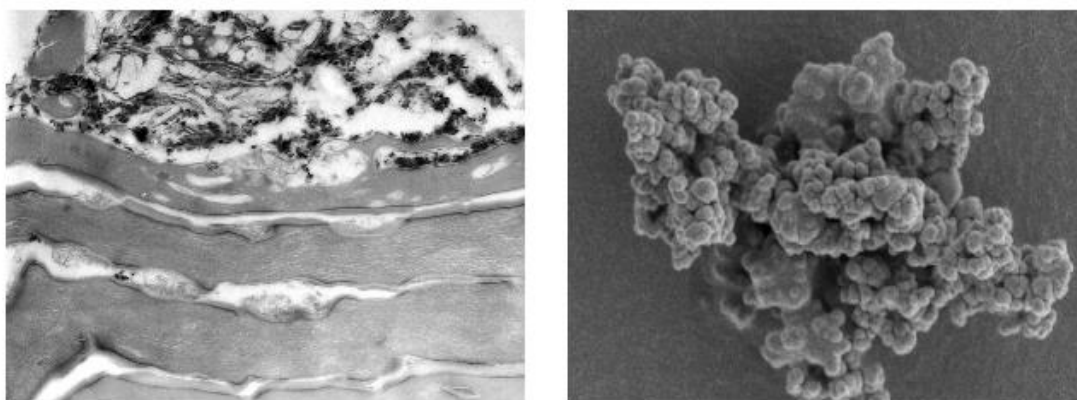


Figura 3. Partículas de nano dióxido de titanio⁵⁶.

Dentro de la industria cosmética es usado en cremas y jabones, también en protectores solares debido a su alto índice de refracción, sus capacidades absorbentes fuertes de la luz UV y su resistencia a la descoloración bajo luz ultravioleta. Esta ventaja realza su estabilidad y capacidad de proteger la piel contra la luz ultravioleta.

Las partículas del TiO_2 , mostradas en la Figura 3, son usadas en protecciones solares combinadas con siliconas.

Las partículas se añaden a esos productos por sus efectos sumamente beneficiosos a la hora de bloquear los rayos ultravioletas en la luz del sol. La exposición excesiva a esta última puede causar el envejecimiento prematuro de la piel, además de cáncer de piel³².

Las nanopartículas a base de titanio son utilizadas en productos de protección solar y cosmética, para mejorar la consistencia y el espesor y se ha convertido en una tendencia entre los productores de cosméticos desde 2010, estimulando gran demanda de dióxido de titanio en el mercado global²⁴.

Las implicaciones ambientales en relación con tal toxicidad y con la biodegradabilidad de las nanopartículas y los efectos de éstas en la salud de las diversidad de especies (incluyendo la humana), en el corto y en el mediano plazo, son de consideración puesto que se estima que podrían interferir en las funciones vitales³⁶.

Se sabe que las nanopartículas presentan un "efecto de caballo de Troya" que actúa como el mejor vehículo para el transporte de compuestos orgánicos¹⁴.

En un estudio se demostró que las nanopartículas de óxidos no necesariamente tienen que entrar en las células para causar toxicidad, pues es el contacto íntimo entre la célula del organismo y las nanopartículas el que pudiera causar la toxicidad.

El TiO_2 causa cambios en el ambiente y en el entorno del organismo al entrar en contacto con las nanopartículas, y aumenta la solubilidad dañando las membranas celulares³⁷.

También en un estudio se observó un considerable grado de mortalidad de *Daphnia magna* cuando es expuesta a nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) y al fullereno (C_{60}).³⁶

3.1.2. Filtros orgánicos (químicos).

Diseñados para absorber la radiación UVA (ej. benzofenonas o dibenzoilmetanos) y radiación UVB (ej. ácido paraaminobenzoico (PABA) y derivados del alcanfor). En general, los protectores solares son compuestos que contienen generalmente una mezcla de varios ingredientes activos que permiten que el producto alcance el SPF requerido por la legislación⁴⁰. Los filtros orgánicos, en comparación con los físicos son más baratos de producir y tienen una mejor aceptación comercial, pero su capacidad para penetrar la piel humana está asociada con reacciones alérgicas y formación de metabolitos dentro del organismo. Muchos estudios han demostrado su presencia en diferentes fluidos humanos, tales como la leche materna, semen y orina³⁹⁻⁴².

3.1.2.1. Benzofenonas.

Las benzofenonas (BP) son compuestos orgánicos ampliamente empleados como filtros UV, debido a su capacidad de absorber, con baja transformación, radiación ultravioleta de los tipos UV-A (ultravioleta de onda larga) y UV-B (ultravioleta de onda media). A esta familia orgánica pertenecen más de 12 compuestos, los cuales se caracterizan por poseer en su estructura una cetona aromática (dos anillos bencénicos, Figura 4) con diferentes sustituyentes (heteroátomo, grupo funcional o grupo alquilo)²⁵.

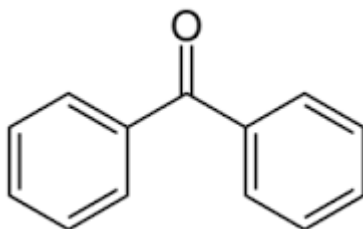


Figura 4. Estructura química general de un parabeno, donde R corresponde a un grupo alquilo.

La benzofenona-3 (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, BP3) ha sido por mucho tiempo el compuesto más empleado de esta familia en diferentes formulaciones industriales y cosméticas. Además de la BP3 sólo la benzofenona 4 (BP4) está permitida para uso en cosmética. Sin

embargo, otros derivados de la benzofenona se utilizan en otros ámbitos industriales, como en la producción de plásticos⁴³.

Algunos estudios indican que la exposición a elevados niveles de compuestos tipo benzofenona puede estar ligada a trastornos relacionados con la producción de estrógenos, como es el caso de la endometriosis en mujeres⁴⁴⁻⁴⁵.

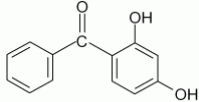
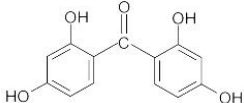
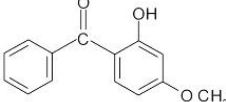
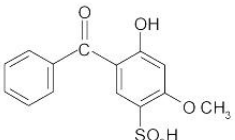
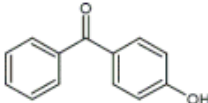
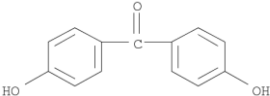
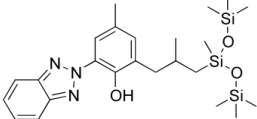
Así mismo, la administración oral y dérmica de BP3 a poblaciones de ratones mostró alteración en diferentes órganos como hígado y riñones y se presume que podría ser causa de eczema de contacto, melanoma y cáncer de mama ya que un alto porcentaje de este compuesto puede penetrar la piel y alcanzar el torrente sanguíneo⁴⁶.

También ha sido reportado que en humanos y animales, BP3 puede ser metabolizada, generando BP1, la cual tiene una actividad estrogénica mucho mayor. Adicionalmente, en cuanto a la BP2, ésta también ha sido asociada con trastornos estrogénicos, los cuales pueden alterar el balance hormonal de diferentes especies incluyendo peces de agua dulce⁴⁵.

La inmersión de BP en diferentes cuerpos de agua puede producirse directamente a través del lavado de la piel y ropa durante actividades recreativas como la natación, o indirectamente a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales las cuales no cuentan con el diseño apropiado para removerlas de las diferentes corrientes que las contienen como producto de procesos tales como lavandería, las duchas o la excreción renal después de absorción oral o percutánea⁴⁷.

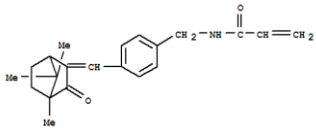
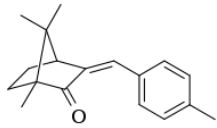
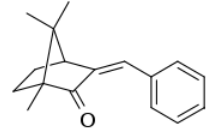
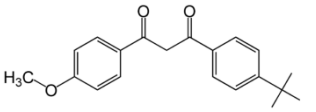
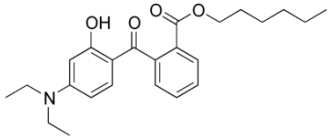
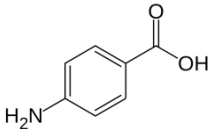
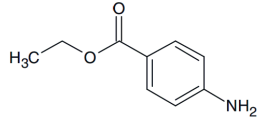
De esta manera, las BP han sido detectadas en aguas residuales, lagos, zonas costeras, ríos y sedimentos^{43,47}. A continuación en la Tabla 2 se presentan las propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos de la familia de los filtros UV, entre ellos la BP3 y el TiO₂.

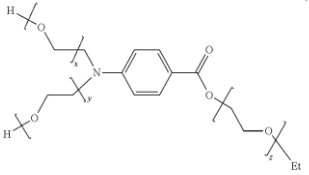
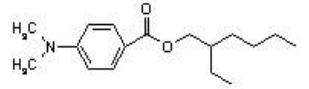
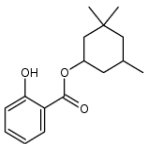
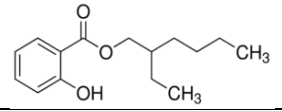
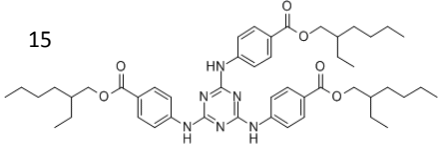
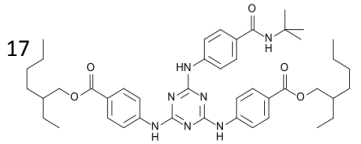
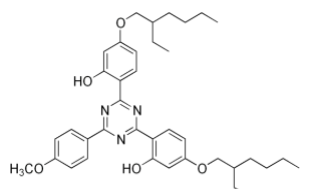
Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos más importantes de la familia de filtros solares.

Physico-chemical properties								
Family	INCI Nomenclature ^a	USAN ^b	CAS no.	EU ref. no.	Structure	MW (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} ^c	Solubility (g L ⁻¹) ^d
<i>Benzophenones</i>								
	benzophenone-1 (BP1)	-	131-56-6	-		214.22	3.15	0.39
	benzophenone-2 (BP2)	-	131-55-5	-		246.22	2.78	0.98
	benzophenone-3 (BP3)	Oxybenzone	131-57-7	4		228.24	3.79	0.21
	benzophenone-4 (BP4)	Sulisobenzone	4065-45-6	22		308.31	0.88	0.65
	4-hydroxybenzophenone (4HB)	-	1137-42-4	-		198.20	2.92	0.41
	4,4 -dihydroxybenzophenone (4DHB)	-	611-99-4	-		214.22	2.19	0.60
<i>Benzotriazoles</i>								
	drometrizole trisiloxane (DRT)	-	2440-22-4	16		225.25	9.79	1.3x10 ⁻⁵

(continued)								
Family	INCI Nomenclature ^a	USAN ^b	CAS no.	EU ref. no.	Structure	MW (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} ^c	Solubility (g L ⁻¹) ^d
<i>Benzimidazole derivatives</i>								
	methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (MBP)	Bisotrizole	103597-45-1	23		658.87	14.35	3.0x10 ⁻⁸
	phenylbenzimidazole sulfonic acid (PMDSA)	Ensulizole	27503-81-7	6		274.30	0.01	0.26
	disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate (DPDT)	Bisdisulizole Disodium	180898-37-7	24		674.60	-	-
<i>Cinnamates</i>								
	ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC)	Octinoxate	5466-77-3	12		290.40	5.80	0.15
	isoamyl p-methoxycinnamate (IMC)	Amiloxate	71617-10-2	14		248.32	4.06	0.06
<i>Camphor Derivatives</i>								
	camphor benzalkonium methosulfate (CBM)	-	52793-97-2	2		409.55	0.28	-
	terephthalylidene dicamphor sulfonic acid (PDSA)	Ecamsule	92761-26-7	7		562.69	1.35	0.01
	benzylidene camphor sulfonic acid (BCSA)	-	56039-58-8	9		320.40	2.74	0.04

(continued)

Family	INCI Nomenclature ^a	USAN ^b	CAS no.	EU ref. no.	Structure	MW (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} ^c	Solubility (g L ⁻¹) ^d
<i>Camphor Derivatives (continuation)</i>								
	polyacrylaminomethyl benzylidene camphor (PCB)	-	113783-61-2	11		-	-	-
	4-methylbenzylidene camphor (4MBC)	Enzacamene	36861-47-9	18		254.37	4.95	5.1x10 ⁻³
	3-benzylidene camphor (3BC)	-	15087-24-8	19		240.34	4.49	9.9x10 ⁻³
<i>Dybenzoyl Methane derivatives</i>								
	butyl methoxydibenzoyl methane (BM-DBM)	Avobenzone	70356-09-1	8		310.39	2.41	0.04
	diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB)	-	302776-68-7	28		397.51	6.93	9.5x10 ⁻⁴
<i>p-Aminobenzoic acid and derivatives</i>								
	4-p-aminobenzoic acid (PABA)	PABA	150-13-0	1		137.14	0.83	915
	Ethyl-PABA (EtPABA)	-	94-09-7	-		165.19	1.86	1.31

(continued)								
Family	INCI Nomenclature ^a	USAN ^b	CAS no.	EU ref. no.	Structure	MW (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} ^c	Solubility (g L ⁻¹) ^d
<i>p</i> -Aminobenzoic acid and derivatives (continuation)								
	ethoxylated ethyl 4-aminobenzoate (PEG-25PABA)	-	113010-52-9	13		277.41	-	-
	ethylhexyldimethyl PABA (OD-PABA)	Padimate O	21245-02-3	21		277.40	5.41 ^c	4.7x10 ⁻³
<i>Salicylates</i>								
	homomenthyl salicylate (HMS)	Homosalate	118-56-9	3		262.35	6.16	0.02
	ethylhexyl salicylate (EHS)	Octisalate	118-60-5	20		250.34	5.77	0.03
<i>Triazines</i>								
	ethylhexyl triazone (OT)	Octyltriazone	88122-99-0	15		826.10	15.53	-
	diethylhexyl butamido triazone (DBT)	Iscotrizinol	154702-15-5	17		765.98	11.90	4.6x10 ⁻⁷
	bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (EMT)	Bemotrizinol	187393-00-6	25		627.81	13.89	4.9x10 ⁻⁸

(continued)								
Family	INCI Nomenclature ^a	USAN ^b	CAS no.	EU ref. no.	Structure	MW (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} ^c	Solubility (g L ⁻¹) ^d
<i>Others</i>								
octocrylene (OC)		Octocrylene	6197-30-4	10		361.49	7.35	2.0x10 ⁻⁴
polysilicone-15 (P-15)		-	308071-69-4	26	 $\text{--- R} = \begin{cases} 92.1 - 92.5\% & \text{--- CH}_3 \\ \text{approx. } 6\% & \text{--- CH}_2\text{CH=CH}_2 \\ \text{approx. } 1.5\% & \text{--- (CH}_2\text{)}_7\text{CH}_3 \end{cases}$ <i>n</i> = 60	5987 ^e	-	0.1x10 ⁻³ ^e
titanium dioxide (TiO ₂)		Titanium Dioxide	13463-67-7	27		79.90 ^f	not applicable ^f	insoluble ^f
1-H-benzotriazole (BZT)		-	95-14-7			119.12	1.23 ^g	20 ^g
5-Me-1-H-benzotriazole (MeBZT)		-	136-85-6			133.15	1.80 ^g	5 ^g

Adapted from Daughton and Ternes, 1999; Díaz-Cruz et al., 2008; Gago-Ferrero et al., 2012; BASF Sunscreen Simulator, 2013.

^a INCI (International Nomenclature for Cosmetic Ingredient) elaborated by COLIPA

^b United States Adopted Names

^c Calculated by use of Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02

^d in water at 25°C

^e SCCS - Opinion on Polysilicone-15 (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_024.pdf)

^f SCCS - Opinion on Titanium Dioxide (nano form) (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_136.pdf)

^g Molins-Delgado et al., 2014

4. Conservantes.

Un conservante es un ingrediente natural o sintético que se agrega a los productos tales como alimentos, productos farmacéuticos y de higiene personal para prevenir el deterioro, ya sea de crecimiento microbiano o cambios químicos indeseables⁷.

El uso de conservantes es esencial en la mayoría de los productos para evitar el daño del producto causado por microorganismos y para proteger el producto de la contaminación inadvertida por el consumidor durante el uso. Un ingrediente que protege el producto del crecimiento de microorganismos se llama un antimicrobiano.

Un conservante se puede añadir también a un producto para protegerlo contra el daño y la degradación causada por la exposición al oxígeno, y en este caso, estos ingredientes también se llaman antioxidantes⁴⁸. Se indica en la Figura 5 los convenientes y la necesidad de utilizar conservante en los PCPs.

Sin conservantes, los productos cosméticos, al igual que los alimentos, pueden contaminarse, lo que lleva a la descomposición del producto y posiblemente irritación o infecciones. La contaminación microbiana de los productos, especialmente los utilizados alrededor de los ojos y en la piel, puede causar problemas significativos.

En la mayoría de los casos, los ingredientes conservantes se utilizan para proteger el producto y ayudar a que permanezca seguro y asegura que funcionará como es durante la vida útil del producto. Los conservantes más utilizados en los productos cosméticos son un grupo de ingredientes a que se refiere generalmente como parabenos (PB).

Estos compuestos evitan el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias y generalmente se utilizan también antioxidantes que mantienen a los PCPs sin que se vuelvan rancios o de color marrón.

Los Productos para el Cuidado Personal rancios pueden no enfermar, pero pueden oler mal o ser de un color o consistencia diferente y no agradable para la vista



Figura 5. Necesidad de conservante en los productos de cuidado personal⁴⁸.

4.1. Parabenos.

Los parabenos son un grupo de productos químicos utilizados como conservantes debido a sus propiedades antimicrobianas.

En las últimas décadas estos compuestos se han utilizado ampliamente en cosméticos y PCPs tales como champús, desodorantes y lociones para el cuerpo, siendo así una solución barata y eficiente que funciona para casi cualquier formulación.

Un dato importante que podemos referir es que los parabenos previamente fueron considerados como seguros en comparación con otros agentes de conservación⁴⁹.

Los parabenos son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, (Figura 6) empleados principalmente como conservantes antimicrobianos en la elaboración de cosméticos, alimentos y diversos productos destinados al cuidado personal debido a su amplia actividad contra bacterias, mohos y levaduras, su bajo costo y alta estabilidad a diferentes pH³⁴. A medida que aumenta la cadena del grupo éster, la actividad antimicrobiana es mayor, pero la solubilidad en agua disminuye.

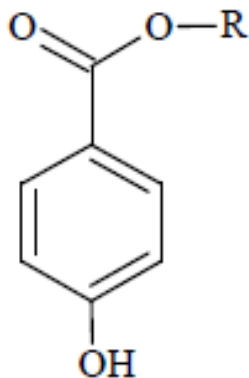


Figura 6. Estructura química general de un parabeno, donde R corresponde a un grupo alquilo.

Son principalmente activos sobre bacterias Gram-positivas y tienen menor efecto sobre esporas bacterianas y ninguno sobre virus y microbacterias⁵⁰. No obstante, los PB, incluyendo al metilparabeno (MeP) y el etilparabeno (EtP), han sido clasificados como potenciales disruptores endocrinos¹².

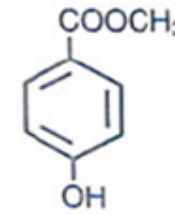
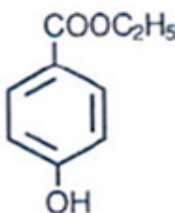
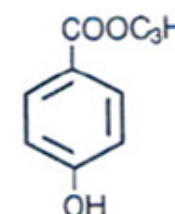
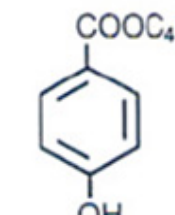
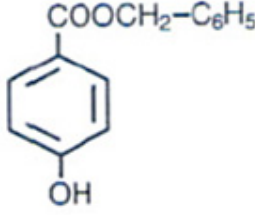
En este sentido, estudios in vivo e in vitro han confirmado que este tipo de compuestos pueden presentar actividad estrogénica e incentivar cierta respuesta cancerígena a nivel celular, lo cual parece estar asociado con el número de carbonos del grupo alquilo⁵¹. Aun así, no ha sido demostrada su relación directa parabenos y cáncer se ha establecido todavía⁵⁴.

Adicionalmente, su uso masivo ha facilitado su introducción a diferentes cuerpos de aguas (ríos lagos, mares, etc.) e incluso ha sido reportado que pueden estar presentes en agua destinada a consumo humano, aire, polvo y suelos. De igual modo, su presencia en efluentes originados en plantas de tratamiento revela que no pueden ser eliminados completamente a través del uso de tratamientos convencionales⁵².

Finalmente, los PB también han sido detectados en fluidos humanos como la orina, el suero sanguíneo y la leche materna, lo cual está asociado a la absorción cutánea o la ingesta involuntaria de este tipo compuestos³⁴.

En la Tabla 3 se muestran las características químicas de algunos parabenos.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los parabenos. Kow: coeficiente de partición octanol-agua.

NOMBRE	CAS N°	Masa Molar (g/mol)	Fórmula Química	Log k _{ow}	ESTRUCTURA
Dióxido de Titanio	13463-67-7	15279,86	TiO ₂	1,86	
Etilparabeno	120-47-8	166,18	C ₉ H ₁₀ O ₃	2,37	
Propilparabeno	94-13-3	180,20	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	2,88	
Butilparabeno	94-26-8	194,23	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	3,5	
Bencilparabeno	94-18-8	228,24	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	3,6	

5. Normativa.

Actualmente, la Directiva 2013/39/UE es la que regula las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Esta directiva modifica la DMA (Directiva Marco del Agua 2000/60/EC) y la EQSD (Environmental Quality Standards Directive) en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y amplía la lista hasta 45 sustancias prioritarias, de las cuales 21 son identificadas como peligrosas, pero ninguna de ellas pertenece a la categoría de los PCPs.

En el Reglamento (UE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos se define producto cosmético, como: toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales.

En dicho Reglamento (CE) no 1223/2009 especifica una concentración máxima del 0,4 % para un solo éster y del 0,8 % para las mezclas de ésteres en relación con el uso de los parabenos, bajo la denominación de ácido p-hidroxibenzoico, sus sales y sus ésteres, como conservantes en los productos cosméticos.

El Reglamento anterior también regula a los filtros UV, como productos de protección solar para uso humano en productos cosméticos. En el anexo IV se recoge una lista de 28 compuestos filtros ultravioleta admitidos en los productos cosméticos. Esta lista incluye 27 filtros orgánicos y 1 filtro inorgánico (TiO₂), y se establecen las concentraciones máximas. En concreto, para el BP3 es de 2% para uso cosmético como filtro solar y para el TiO₂ es del 25%. En la Tabla 4 se detallan todos los compuestos permitidos en la UE.

España, regula el uso de estos compuestos mediante el Real Decreto sobre Productos cosméticos el cual ha sufrido varias modificaciones mediante el Real Decreto 2131/2004, el Real Decreto 209/2005 y el Real Decreto 944/2010.

Tabla 4 Anexo IV Filtros solares UV permitidos en la UE (CPR, EC/1223/2009).

Número de referencia	Identificación de las sustancias				
	Nombre químico/DCI/XAN	Nombre común del ingrediente recogido en el glosario	Número CAS	Número CE	Concentración máxima en el producto preparado para el uso
a	b	c	d	e	g
1	Ácido 4-aminobenzoico	PABA	150-13-0	205-753-0	5 %
2	Metilsulfato de <i>N,N,N</i> -trimetil-4-[(2-oxo-3 borniliden)-metil]-anilina	Camphor benzalkonium methosulfate	52793-97-2	258-190-8	6 %
3	Benzoato de 2-hidroxi-, 3,3,5-trimetilciclohexílico/homosalato	Homosalate	118-56-9	204-260-8	10 %
4	2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona/oxibenzona (a)	Benzophenone-3	131-57-7	205-031-5	10 %
5	Desplazado o eliminado				
6	Ácido 2-fenil-5-bencimidazol sulfónico y sus sales de potasio, de sodio y de trietanolamina/ensulizol	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	27503-81-7	248-502-0	8 % (de ácido)
7	Ácido 3,3'-(1,4-fenilendimetilen)bis[7,7-dimetil-2-oxobiciclo[221]hept-1-il-metano]sulfónico y sus sales/Ecamsul	Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid	92761-26-7, 90457-82-2	410-960-6	10 % (de ácido)
8	1-(4- <i>tert</i> -Butil-fenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1,3-diona/avobenzona	Butyl nethoxydibenzoylmethane	70356-09-1	274-581-6	5 %
9	Ácido α -(2-Oxoborn-3-ilideno)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Benzylidene camphor sulfonic acid	56039-58-8		6 % (de ácido)
10	Ester 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3,3-difenilacrílico/octocrileno	Octocrylene	6197-30-4	228-250-8	10 % (de ácido)
11	Polímero de <i>N</i> -{(2 y 4)-[(2-oxoborn-3-iliden)metil]bencil}acrilamida	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	113783-61-2		6 %
12	Metoxicinamato de octilo/octinoxato	Ethylhexyl methoxycinnamate	5466-77-3	226-775-7	10 %
13	Etil-4-aminobenzoato etoxilado	PEG-25 PABA	116242-27-4		10 %
14	Isopentil-4-metoxicinamato/amiloxato	Isoamyl p-methoxycinnamate	71617-10-2	275-702-5	10 %

15	2,4,6-Trianiilino- <i>p</i> -carbo-2'-etilhexil-1'oxi)-1,3,5-triazina	Ethylhexyl triazone	88122-99-0	402-070-1	5 %
16	2-(2 <i>H</i> -Benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)-disiloxani)propilo) fenol	Drometrisole trisiloxane	155633-54-8		15 %

Continuación

Número de referencia	Identificación de las sustancias				
	Nombre químico/DCI/XAN	Nombre común del ingrediente recogido en el glosario	Número CAS	Número CE	Concentración máxima en el producto preparado para el uso
a	b	c	d	e	g
17	Benzoato Bis(2-etilhexil) bis(4,4'-[[6-[[4-[[[(1,1-dimetil-etil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]iscotrizinol (USAN)	Diethylhexyl butamido triazone	154702-15-5		10 %
18	3-(4'-Metilbencilideno)- <i>D,L</i> -1 alcanfor/enzacameno	4-Methylbenzylidene camphor	38102-62-4/36861-47-9	-/253-242-6	4 %
19	3-Bencilideno alcanfor	3-Benzylidene camphor	15087-24-8	239-139-9	2 %
20	Salicilato de 2-etilhexilo/octisalato	Ethylhexyl salicylate	118-60-5	204-263-4	5 %
21	Benzoato de 4-(dimetilamino)-2-etilhexilo/padimato O (USAN:BAN)	Ethylhexyl dimethyl PABA	21245-02-3	244-289-3	8 %
22	Ácido 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico y su sal de sodio (Sulisobenzona, Sulisobenzona sódica)	Benzophenone-4, benzophen one-5	4065-45-6/6628-37-1	223-772-2/-	5 % (de ácido)
23	2,2'-Metilen-bis-6-(2 <i>H</i> -benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol/bisocotrizol	Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	103597-45-1	403-800-1	10 %
24	Sal sódica del ácido 2-2'-bis-(1,4-fenilen)1 <i>H</i> -bencimidazol,4,6-disulfónico/bisdisulizol disódico (USAN)	Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate	180898-37-7	429-750-0	10 % (de ácido)
25	2,2'-(6-(4-Metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil)bis(5-((2-etilhexil)oxi)fenol)/Bemotrizino	Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	187393-00-6		10 %
26	Benzalmalonato de dimeticodietilo	Polysilicone-15	207574-74-1	426-000-4	10 %

27	Dióxido de titanio ^(b)	Titanium dioxide	13463-67-7/1317-70-0/1317-80-2	236-675-5/205-280-1/215-282-2	25 %
28	Hexilbenzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoilo]	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	302776-68-7	443-860-6	10 % en productos de protección solar

^a No se exigirá esta mención cuando la concentración sea igual o inferior al 0,5 % y cuando la sustancia solo se utilice para proteger el producto

^b Con usos distintos del uso como colorante, véase el anexo IV, no 143.

6. Objetivos.

A continuación se describen el objetivo general y los objetivos específicos de este trabajo.

6.1. Objetivo general.

Determinar la toxicidad aguda de ingredientes utilizados en productos de cuidado personal mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna* y alga marina *Phaeodactylum tricornutum*.

6.2. Objetivos específicos.

Los objetivos específicos de nuestro estudio, son los siguientes:

1. Determinar la sensibilidad de la *Daphnia magna* expuestos a dióxido de titanio, metilparabeno, propilparabeno y bencilparabeno.
2. Determinar la sensibilidad de la alga marina *Phaeodactylum tricornutum* expuestos a dióxido de titanio y benzofenona-3.
3. Evaluación de la posibilidad de efectos toxicológicos aditivos en mezclas binarias de productos de cuidado personal en *Daphnia magna*.

7. Material y método.

Para los tres bioensayos se ha utilizado para medir la densidad óptica un Espectrofotómetro visible Jenway 6300 Bibby Scientific Ltd. Staffordshire (Paris, Francia), una incubadora y un microscopio estereoscópico SZT de VWR (Llinars del Vallés, España) utilizado en los bioensayos con *Daphnia magna*.

Se prepararon soluciones para los tres bioensayos, con 10 mg de TiO₂, MeP, PrP, BzP y BP3, y se disolvieron en 100 ml de medio de cultivo, para después adicionarlos a diferentes concentraciones en las cubetas y/o celdas que contienen las *Daphnias* y las algas según el bioensayo a realizar.

Para presentar los resultados con las curvas de toxicidad de cada compuesto se ha utilizado el programa Graph Pad Prism, de Graph Pad Software Inc. (La Jolla, USA).

7.1. Estudios de toxicidad con *Daphnia magna*.

Se obtuvieron los estándares metilparabeno (MeP) 99,9% de pureza, propilparabeno (PrP) 99 %, bencilparabeno (BzP) 99% y dióxido de titanio 99,5% y benzofenona-3 99% de Sigma-Aldrich (Múnich, Alemania).

Los ensayos de Toxicidad aguda de *Daphnia magna* se realizaron de acuerdo a la norma ISO 6341. El kit con el equipamiento necesario para llevar a cabo el bioensayo en conformidad con los métodos aprobados fue el Daphtoxkit F™ magna de Microbio Test Inc. (Gent, Bélgica).

7.1.1. Preparación del medio de incubación.

Disponemos en un matraz aforado de 2000 ml aproximadamente 1 L de agua destilada aproximadamente un litro. Se vierten dentro del matraz el vial del kit marcado con el número 1 que contiene la solución de NaHCO₃. Se repite esta operación para los otros 3 viales: vial 2 con CaCl₂, Vial 3 con solución de MgSO₄ y por último el vial 4 KCl, respetando esta secuencia. Por último se añade agua hasta enrasar el matraz aforado.

Esta disolución se tapa y agita vigorosamente para homogeneizarla. Este medio de incubación se trasvasa a un envase y se almacena en la nevera a 4°C.

7.1.2. Eclosión de los efipios o *Daphnia magna*.

La incubación de los efipios debe iniciarse 3 días antes de las pruebas de Toxicidad. Para esto se vierte el contenido de cada vial (6), con efipios en el microtamiz del kit; asegurándonos que todos los efipios se transfieren, enjuagamos con el medio que preparamos anteriormente para eliminar todos los residuos del medio de almacenamiento en el que son proporcionados. Se transfieren a las placas de Petri de eclosión en 15 ml del medio preparado, tal y como se muestra en la Figura 7 y se cubre la placa de Petri y se incuba durante 72 h a 20-22 ° C bajo iluminación de 6000 lux, con ciclos de 8 horas de oscuridad. El desarrollo embrionario de los huevos de *Daphnia magna* dura aproximadamente 3 días en condiciones óptimas de iluminación y temperatura antes mencionadas.

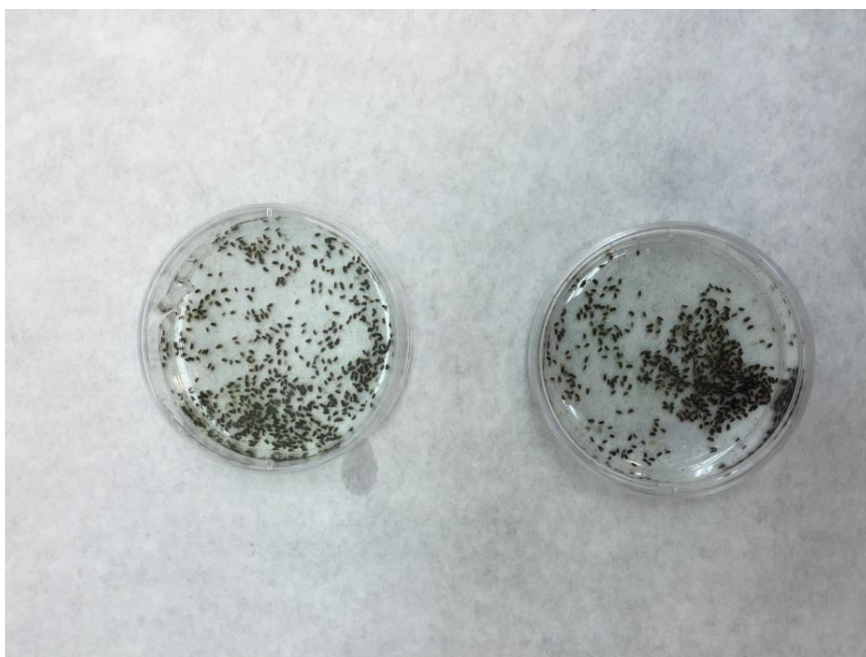


Figura 7. *Daphnia magna* en placas Petri.

7.1.3. Bioensayos.

Para la determinación de la Toxicidad aguda del TiO_2 , MeP, PrP y BzP (primer experimento), se emplearon neonatos de *Daphnia magna* expuestos a diferentes concentraciones, durante los periodos de 24, 48 y 72 horas. Como resultado de dicha exposición es posible determinar la Toxicidad de los compuestos diana que produce la inmovilización del 50% de la población de los neonatos expuestos.

Para la determinación de Toxicidad aguda de mezclas de compuestos (segundo experimento) también se emplearon neonatos de *Daphnia magna* expuestos a tres mezclas de compuestos tóxicos a diferentes concentraciones: TiO_2 -BzP, TiO_2 -BP3 y BzP-BP3 durante los periodos de 24, 48 y 72 horas. Como resultado de dicha exposición es posible determinar la toxicidad de las mezclas, que producirá la inmovilización del 50% de la población de los neonatos expuestos.

Así, 2 horas antes de realizar los experimentos se alimentan a las *Daphnias* con una suspensión de microalga *Espirulina*, pues les proporciona una reserva energética y se opone a la mortalidad por inanición, durante las próximas 48 horas que dura el experimento.

Para el primer experimento se llevan a cabo pruebas con las diferentes concentraciones a partir de las disoluciones preparadas con anterioridad. Para el MeP se utilizan 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 y 40 mg/L. Para el PrP se utilizan concentraciones de 2, 5, 9, 12, 13, 15 y 20 mg/L. Para el BzP se utilizan 2, 2.5, 2.8, 3, 3.5, 4, 4.2 y 4.5 mg/L y por último para el TiO_2 se utilizan concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.3, 2.5, 3 y 6 mg/L.

Se preparan las cubetas, que se muestran en la Figura 8, vertiendo las cantidades necesarias de las disoluciones de los compuestos en estudio para alcanzar las diferentes concentraciones a estudiar. Se completa con 10 ml del medio de crecimiento de *Daphnia magna*, y finalmente se transfieren 10 neonatos con una micropipeta a cada cubeta.

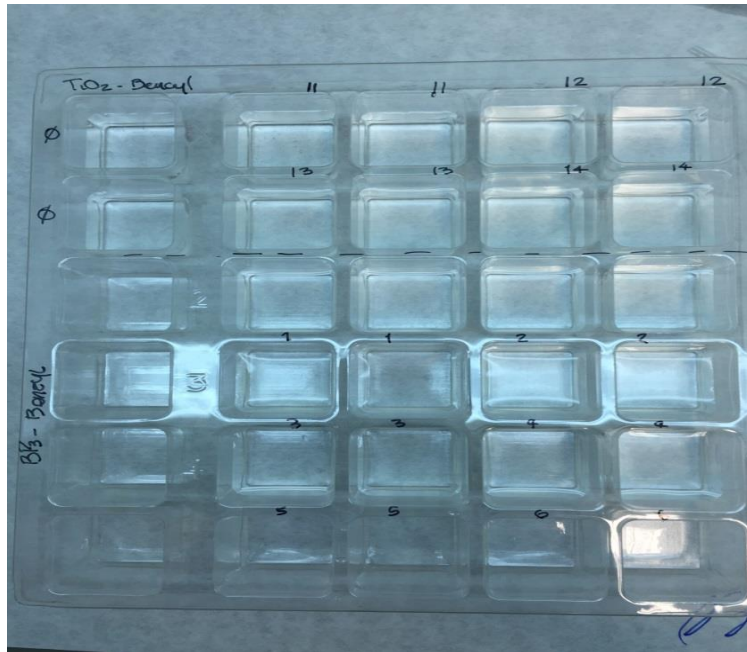


Figura 8. Cubetas para bioensayos de Toxicidad con *Daphnia magna*.

Terminada la transferencia de los neonatos a las cubetas, se cubren éstas con parafilm y se colocan bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura, es decir a 20° C y oscuridad, en periodos de 24, 48 y 72 h.

Transcurridas 24 h, se revisan las cubetas con la ayuda de un microscopio, como se muestra en la Figura 9, y se registra el número de organismos muertos en cada una de las cubetas, que se reconoce por la carencia de movilidad de los organismos. Del mismo modo se hicieron los demás experimentos a 48 y 72 h de exposición a los contaminantes.

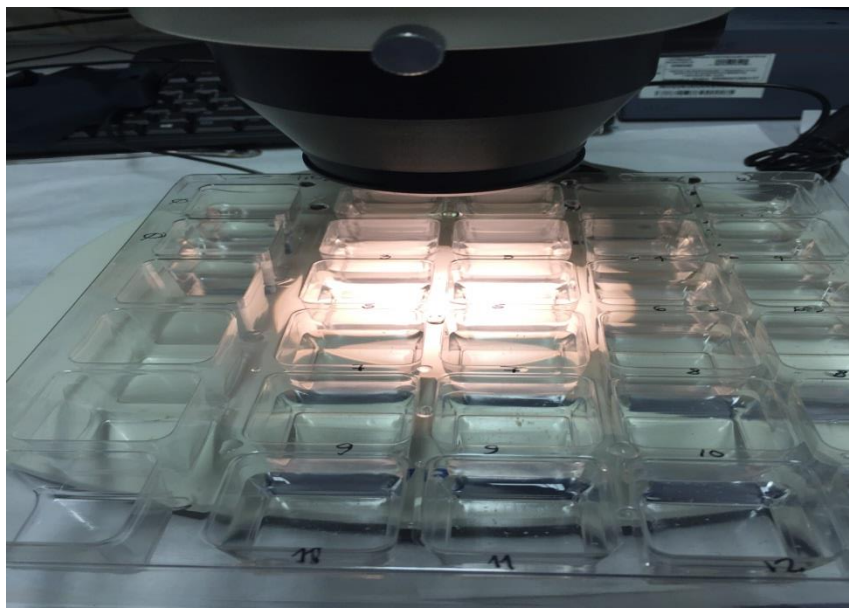


Figura 9. Conteo de organismos inhibidos.

Definiremos la Concentración Efectiva Media (EC_{50}) como la concentración estadísticamente derivada de un tóxico que, según se puede pronosticar, causará un efecto no letal definido en 50% de una población dada de organismos bajo condiciones definidas³³.

Para calcular el valor de EC_{50} , disponemos de un software para el tratamiento automático de datos, el GraphPad Prism. Así, introducimos los valores de inhibición, según las horas y nos proporciona la curva de toxicidad y el valor de EC_{50} de cada compuesto. El procedimiento es el mismo para el segundo experimento, determinación de la toxicidad aguda de las mezclas binarias de los compuestos.

7.2 . Estudios de Toxicidad con la alga marina *Phaeodactylum tricornutum*.

El kit con el equipamiento necesario para llevar a cabo el bioensayo en conformidad con los métodos aprobados fue el Marine Algal Toxkit de Microbio Test Inc. (Gent, Bélgica).

Como parámetro del crecimiento/inhibición del alga marina *Phaeodactylum tricornutum*, se utiliza la Densidad Óptica (DO) a longitud de onda 670 nm.

EL bioensayo se lleva a cabo en cubetas de 10 cm, utilizando un espectrofotómetro equipado con un contenedor especial para estas dichas cubetas. Los ensayos de toxicidad aguda de la alga se realizaron de acuerdo a la norma ISO/CD 10253.

7.2.1. Preparación del medio de cultivo para el alga.

El medio de cultivo se prepara de forma similar a lo descrito previamente para el medio de incubación de las *Daphnias*. Se llena un matraz aforado de 2 L con aproximadamente 1500 ml de agua desionizada. Tomamos el vial 1 del kit, que contiene NaCl y se vierte el contenido en el matraz. Hay que agitar hasta total disolución de la sal.

Esto se repite con las disoluciones de KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, H₃BO₃, respetando la secuencia de adición. A continuación, se añaden los nutrientes etiquetados como disolución A, 1 ml de la disolución B y 2 ml de la solución C en el matraz aforado, y se añade agua desionizada hasta los 2 L. y se agita vigorosamente para homogeneizar.

7.2.2. Cultivo de la alga *Phaeodactylum tricornutum*.

Para cultivar la alga se toma uno de los dos tubos que contienen la microalga inóculo, y se agita vigorosamente antes de verter el contenido en una de las celdas pre-cultivo del kit.

Se enjuaga el tubo que contiene la alga dos veces con 7.5 ml de medio de cultivo y se transfiere el contenido en la celda de pre-cultivo para asegurar la transferencia total de las microalgas.

Se cierra la celda pre-cultivo y se incuba durante 4 días a temperatura controlada de 20 °C (+/- 2 °C), con una iluminación de 600 lux con ciclos de 8 horas de oscuridad. Cabe señalar que la metodología para este kit de Toxicidad, señala 3 días de incubación, pero para las condiciones de iluminación que disponíamos, tuvimos que prolongar 2 días más el período de cultivo a fin de que crecieran todos los inóculos.

7.2.3. Bioensayos.

Para empezar con la inoculación de las microalgas, tomamos las dos celdas denominadas "Calibration cell" y "Algal Stock cell". En la celda de calibración ("Calibration cell") se adicionan 25 ml de medio de cultivo, se cierra con la tapa y se mide la DO a longitud de onda 670 nm. Con esta medida se calibra el equipo.

En la otra celda se adicionan 25 ml de la suspensión de algas y la agitamos suavemente, girando la celda de arriba a abajo mediante un movimiento de rotación durante unos segundos, para distribuirla homogéneamente por toda la celda. Cuando ya hemos distribuido homogéneamente la suspensión de las algas hacemos la lectura de la Densidad Óptica de la suspensión (OD_1) en el espectrofotómetro con el aparato ya calibrado.

Cuando tenemos este valor, tomaremos la tabla OD/N que es específica para cada kit, y encontraremos el número de algas (N_1) correspondiente a la OD_1 que acabamos de medir. Siguiendo la normativa ISO/CD 10253, es necesario iniciar el ensayo con N_2 equivalente a $1 \cdot 10^6$ algas/ml, debemos calcular el factor de dilución N_1/N_2 necesario para obtener una densidad óptica OD_2 correspondiente a la densidad de $1 \cdot 10^6$ algas/ml.

Para conseguir la concentración inicial que necesitamos, transferimos la suspensión de algas de la celda "Algal Stock cell" a un matraz aforado de 100 ml y añadimos el volumen necesario de medio de cultivo para obtener $1 \cdot 10^6$ algas/ml. Cerramos el matraz y agitamos para homogeneizar.

Llenamos de nuevo la celda "Algal Stock cell" transfiriendo a ella 25 ml de la nueva suspensión, cerramos y agitamos, mediante el procedimiento descrito anteriormente y leemos la nueva DO. Comprobamos la relación OD/N para ver si la DO ahora medida corresponde al valor requerido de OD_2 de $1 \cdot 10^6$ algas/ml. En caso de que la concentración sea superior a $1 \cdot 10^6$ algas/ml, tenemos que volver a realizar la operación anterior de dilución de la suspensión de algas hasta alcanzar la OD que corresponde a la concentración que necesitamos.

7.2.4. Preparación de las diluciones.

Para preparar las disoluciones de los contaminantes a analizar se utilizó como referencia la solubilidad intrínseca de cada compuesto y se usó el medio de cultivo preparado como disolvente. La mayoría de compuestos estudiados son sólidos a temperatura ambiente. Se debe diluir primero con un poco de medio de cultivo (disolvente) en un vaso de precipitados y luego trasvasarlo un matraz aforado para hacer la disolución al volumen exacto requerido.

Para el ensayo se prepararon una serie de diluciones de los tóxicos a evaluar y según la ISO/CD 10253 se recomienda añadir 0,9 ml de la suspensión preparada de microalgas de $1 \cdot 10^6$ algas/ml en cada matraz aforado de 100 ml para obtener una concentración inicial de $1 \cdot 10^4$ algas/ml.

Se prepararon disoluciones de los dos contaminantes a 0.005, 0.01, 0.1 0.8, 1.5 y 4 15, 20 y 30 mg/L para TiO_2 y 0.01, 0.05, 0.1, 1.2, 4, 10, 20, y 30 mg/L para bencilparabeno. Cuando se tienen todas las disoluciones, se agita vigorosamente y añadimos 25 ml de cada una de ellas a las celdas. Se realizaron dos réplicas de cada concentración.

Cerramos las celdas y agitamos antes de medir la DO en el espectrofotómetro como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Lectura de la densidad óptica (DO).

7.2.5. Incubación de las celdas.

Para la incubación, se levantaron ligeramente las tapas de las celdas se deslizó la tira de plástico de parafilm en la parte abierta, teniendo cuidado de dejar una abertura cerca de la mitad de las celdas para el intercambio de gases.

Una vez abiertas, las celdas se colocaron en la bandeja de retención de forma aleatoria, con el fin de compensar las posibles diferencias durante la incubación. Se colocaron las bandejas en una habitación con temperatura y luz controladas.

8. Tratamiento de los datos.

8.1. Para *Daphnia magna*.

Para los bioensayos con *Daphnia magna* se realiza los cálculos de los porcentajes de inhibición para así obtener por medio del software Graph Pad Prism los perfiles de respuesta y los EC₅₀ de cada compuesto.

En este caso, se registra el número de organismos sin movimiento frente a los que están activos movimiento en cada cubeta. Esto se realiza para cada nivel de concentración ensayado de los compuestos y se calcula el porcentaje de inhibición por medio de los datos que se registran a lo largo del experimento de exposición, es decir a las 24, 48 y 72 h ensayadas.

Las tasas de incidencia (%I) para cada compuesto se calcularon por medio de la ecuación 1:

$$I = \frac{D_i}{D_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde D_i es el número de neonatos inmovilizados, y D_0 es el número de neonatos al inicio del test (tiempo de exposición cero). I es entonces la correlación de las concentraciones de los compuestos químicos de destino mediante la ecuación 2:

$$I = B + \frac{(T-B)}{(1+10^{((\text{LogEC}_{50}-X)*H)})} \quad (2)$$

Donde T es el valor superior de la curva, B es el parámetro inferior de la curva, LogEC_{50} es el logaritmo de la concentración de efecto mediano, X es el logaritmo de la concentración del compuesto químico, y H es el coeficiente de inflexión de la curva.

8.2. Para la alga marina *Phaeodactylum tricornutum*.

Para las algas marinas *Phaeodactylum tricornutum*, determinamos en cada celda la DO después de 24, 48 y 72 h. de exposición. Se calculan los valores de inhibición según la densidad óptica por medio de las ecuaciones 3 y 4:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0} \quad (3)$$

$$I_{\mu_i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad (4).$$

Donde N_L es la densidad óptica del alga, el N_0 es la densidad óptica inicial del alga, t_L es el tiempo de la última medición del periodo de crecimiento exponencial y t_0 es el tiempo inicial y μ_i es la tasa de crecimiento específico, μ_c es la tasa de crecimiento específico de control e I_{μ_i} es la tasa de incidencia, en la ecuación 4.

Para calcular el valor de EC_{50} en los bioensayos, disponemos del programa informático con regresiones lineales para un tratamiento automático de datos, el GraphPad Prism. Donde introducimos los valores de inhibición, obtenidos utilizando estas fórmulas antes mencionadas, según las horas y nos da la curva de toxicidad y la EC_{50} de cada compuesto.

9. Resultados y discusión.

La metodología anteriormente descrita se aplicó en el presente estudio en muestras de dos organismos con la finalidad de analizar algunos ingredientes de PCPs que pueden acumularse en los principales cuerpos de agua. A continuación se presentan los resultados obtenidos y se discute el riesgo ambiental en medioambiente acuático.

9.1. Estudios de Toxicidad aguda para *Daphnia magna*.

Para poder determinar el valor de EC_{50} de los compuestos individuales ensayamos diferentes concentraciones de TiO_2 , MeP, PrP y BzP, para tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h. Se llevó a cabo el bioensayo con concentraciones en el rango 0.05 - 40 mg/L para cada uno de los compuestos.

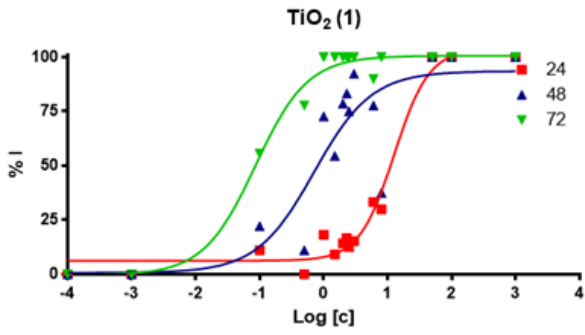
Las concentraciones que se utilizaron para cada uno de los compuestos se seleccionaron en base a estudios previos donde el valor de EC_{50} se tomó como centro del intervalo de concentraciones a ensayar.

En la Tabla 5, se presenta los valores de la EC_{50} obtenidos en los bioensayos realizados por duplicado, para cada tiempo de exposición. El tiempo de exposición de 48h es el que establece la norma ISO 6341 para el kit de toxicidad de *Daphnia magna*, ya permite establecer el cuadro de mortalidades que conduce al cálculo de la EC_{50} . Los valores de toxicidad a los otros intervalos de tiempo son solo estimaciones. Para los 4 compuestos se toma el valor más bajo calculado de las dos replicas.

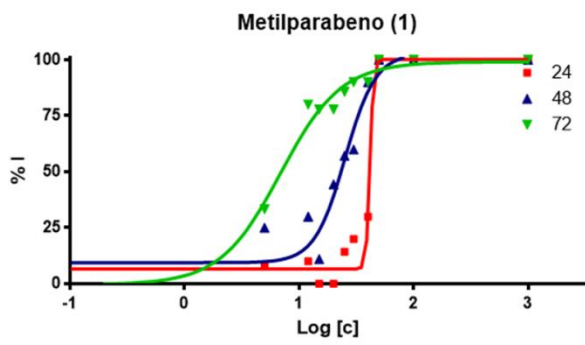
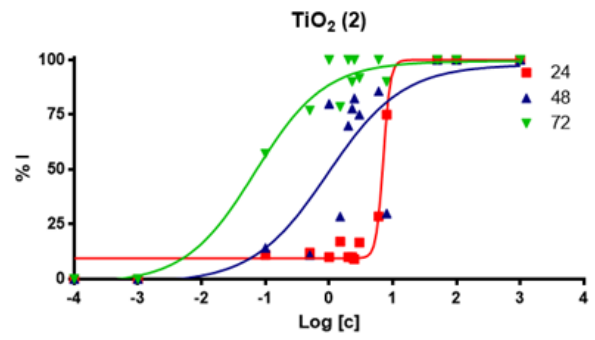
Tabla 5. Valor de EC50 de los compuestos estudiados en diferentes tiempos de exposición.

Compuesto	Bioensayo	EC50 (mg/L)		
		24h	48h	72h
TiO ₂	1	20	3,096	0,0548
	2	7,608	5,391	0,1361
MeP	1	54,04	32,51	8,893
	2	nd	33,88	nd
PrP	1	18,92	3,872	2,092
	2	18,66	3,806	2,34
BzP	1	33,63	3,05	0,1258
	2	37,17	1,354	0,5781

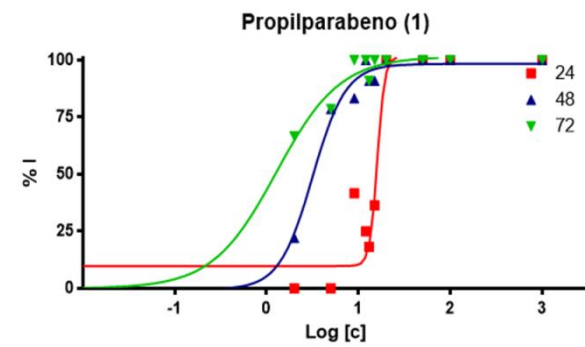
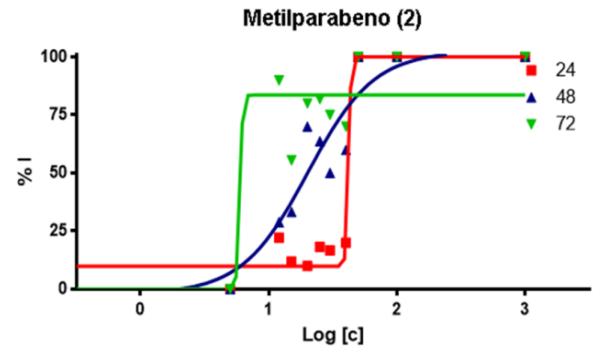
En las curvas de toxicidad se representa el valor del porcentaje de inhibición frente al logaritmo de la concentración a los tres tiempos de exposición como se muestran en la Figura 11. La obtención del valor de EC₅₀ se calculó por medio de la ecuación 2, y representan los valores de concentración correspondientes al 50% de inhibición (punto de inflexión de las curvas).



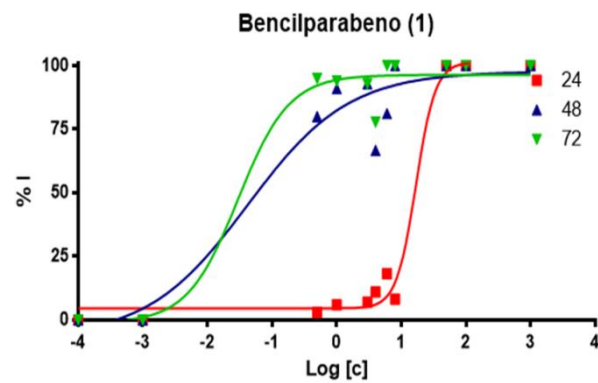
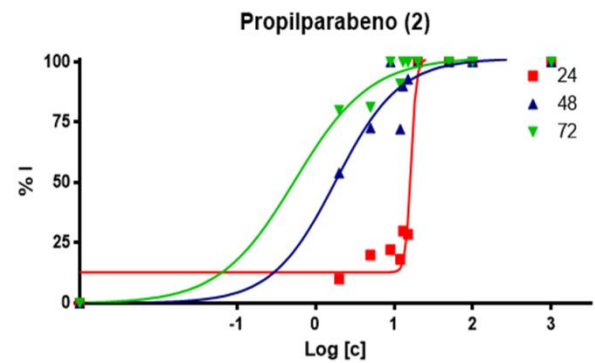
(11a)



(11b)



(11c)



(11d)

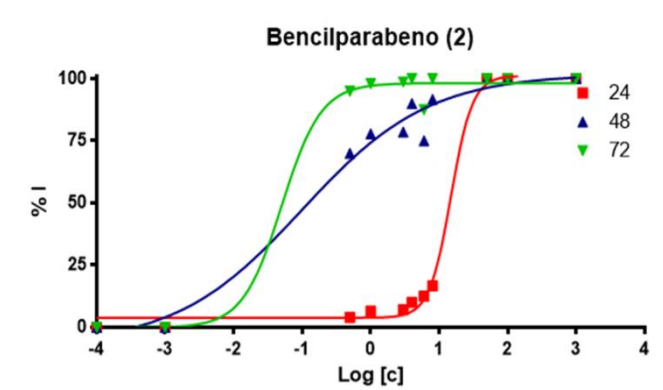


Figura 11. Resultados de Toxicidad para 24, 48 y 72 h de exposición a los compuestos: TiO_2 (a), MeP (b), PrP (c) y BzP (d) en *Daphnia magna*.

Para el TiO₂, Figura (11a), se seleccionaron concentraciones en el rango de 0.5 a 3 mg/L y se hacen los test por duplicado. Se observa que a mayor tiempo de exposición es necesaria una menor concentración para causar efectos tóxicos. Es así como se obtuvo una EC₅₀ a las 48 horas de 3,09 mg/L para la primer replica, y para la segunda de 5,391 mg/L, como se muestra en la Tabla 5.

A las 72 horas el valor de EC₅₀ es de 0,0548 mg/L, el más bajo que se registra. Este resultado es debido en parte a la variabilidad en la respuesta experimentada por los diversos organismos, en este caso cada *Daphnia* en particular.

Como se observa en la Figura (11b), el comportamiento del MeP es similar al comportamiento del TiO₂. Para este compuesto se utilizaron concentraciones en el rango 5 - 40 mg/L. En la Tabla 5 se observa que para la primer replica se obtiene un valor de EC₅₀ de 32,52 mg/L mientras que para la segunda replica se obtiene 33,88 mg/L. En comparación con datos publicados anteriormente Dobbins et al⁵³, revelaron que estos resultados eran algo diferentes a los de nuestro estudio, pues se obtuvo un valor de EC₅₀ de 24,6 mg/L.

También en la Tabla 5 se observa que los valores de EC₅₀ para la primer replica en 24 y 72 h son de 54,04 mg/L y 8,893 mg/L respectivamente, pero para la segunda replica en los dos tiempos de exposición antes mencionados, no se pudieron calcular. Ello se debe a que el rango de concentraciones seleccionado para el ensayo producía toxicidades similares por lo que al estar los puntos agrupados el software, aunque era capaz de representar una sigmoide proporcionaba un valor de EC₅₀ no fiable.

En el caso del PrP, Figura (11c), se experimentó con concentraciones en un rango de 2 a 15 mg/L, y esta vez observamos que los dos ensayos proporcionaron resultados muy similares obteniéndose un valor de EC₅₀ para un tiempo de exposición de 48 horas de 3,872 mg/L en la primer replica y para el segundo de 3,806 mg/L, como se muestra en la Tabla 5.

Para el BzP, Figura (11d), se ensayaron concentraciones de 2 a 4.5 mg/L obteniéndose valores de EC₅₀ en la primer replica de 3,05 mg/L y en la segunda de 1,354 mg/L a las 48 h. Al igual que los otros tres compuestos, a mayor tiempo de exposición, menor concentración se necesita para causar un efecto tóxico sobre las *Daphnias*.

9.2. Estudios de Toxicidad aguda para *Phaeodactylum tricornutum*.

Para este bioensayo se llevaron a cabo 4 réplicas. Se siguió la inhibición del crecimiento de la alga por la exposición a TiO₂ y BzP. Los compuestos fueron elegidos por mostrar mayor toxicidad en el primer bioensayo llevado a cabo con *Daphnia magna*.

El valor de EC₅₀ se calculó tras exposición de las algas a 24, 48 y 72h siendo este último tiempo el más adecuado para la determinación de la EC₅₀, ya que es el tiempo que marca la norma ISO/CD 10253 para la que está diseñado el kit de toxicidad aguda con esta alga.

Para poder determinar el valor de EC₅₀ de los compuestos individuales ensayamos diferentes concentraciones de TiO₂ y BzP para tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h. Se llevó a cabo el bioensayo con concentraciones en el rango 0.005 - 30 mg/L para cada uno de los compuestos. En estos bioensayos se determina el % de Inhibición del crecimiento de las algas por la asimilación de CO₂.

Para TiO₂ resulta un valor de EC₅₀ 2,27 mg/L, tomándose en cuenta el más bajo de las 4 réplicas en los dos bioensayos, y un valor de EC₅₀ para BzP de 10,61 mg/L. Al comparar los valores que pudieron calcularse de EC₅₀ para 24, 48 y 72h, se observa que no existe una inhibición significativa dentro de las 48h, pero si hay una reducción de la concentración a las 72h en los dos compuestos.

En la Tabla 6 se observa que algunos valores no se calcularon para el BzP, esto posiblemente por no mostrar ningún efecto significativo dentro de las 48h dentro del intervalo de concentraciones ensayadas. En un estudio reciente Wang et al 2007³⁶ se demostró la inhibición de la alga a exposición a BzP, obteniéndose un valor de EC₅₀ de 12.65 mg/L, a lo que en nuestro estudio difiere y se encontró un valor más bajo de 10,61 mg/L.

La Tabla 6 recoge los valores encontrados de EC₅₀ para cada compuesto y los diferentes tiempos para las 4 réplicas que se realizaron de los bioensayos.

Tabla 6. EC₅₀ de TiO₂ y BzP estudiados en 24, 48 y 72 h.

Compuesto	Bioensayo	EC ₅₀ (mg/L)		
		24h	48h	72h
TiO ₂	1	7,811	26,68	14,51
	2	8,057	19,26	17,08
	3	8,32	32,82	3,49
	4	7,88	13,66	2,273
BzP	1	21,97	nd	10,61
	2	nd	28,54	14,32
	3	nd	nd	15,78
	4	0,2658	nd	10,72

La toxicidad observada para el TiO₂, Figura (12a) es de EC₅₀ 13,66 mg/L a las 48 horas, podemos considerar que este tipo de organismo es resistente durante las primeras 48 horas, sin embargo a medida que avanza el tiempo encontramos que a las 72 horas se tiene un valor de EC₅₀ más bajo.

Se observa que la inhibición máxima alcanzada a las 48 horas es del 78% y a las 72 horas la inhibición máxima es del 60%. Así pues, parece como si el alga primero se aclimatara antes de padecer un efecto tóxico.

En el caso del BzP, Figura (12b), se utilizaron concentraciones de 0.005 hasta 30 mg/L, un rango bastante amplio de trabajo. Pese a ello, en ninguno de los 4 experimentos se consiguieron los datos a todos los tiempos de exposición.

Para este compuesto la inhibición máxima es de 74% en 48 horas y 40% para 72 horas. En comparación con el dióxido de titanio se obtienen valores de inhibición mayores para este compuesto.

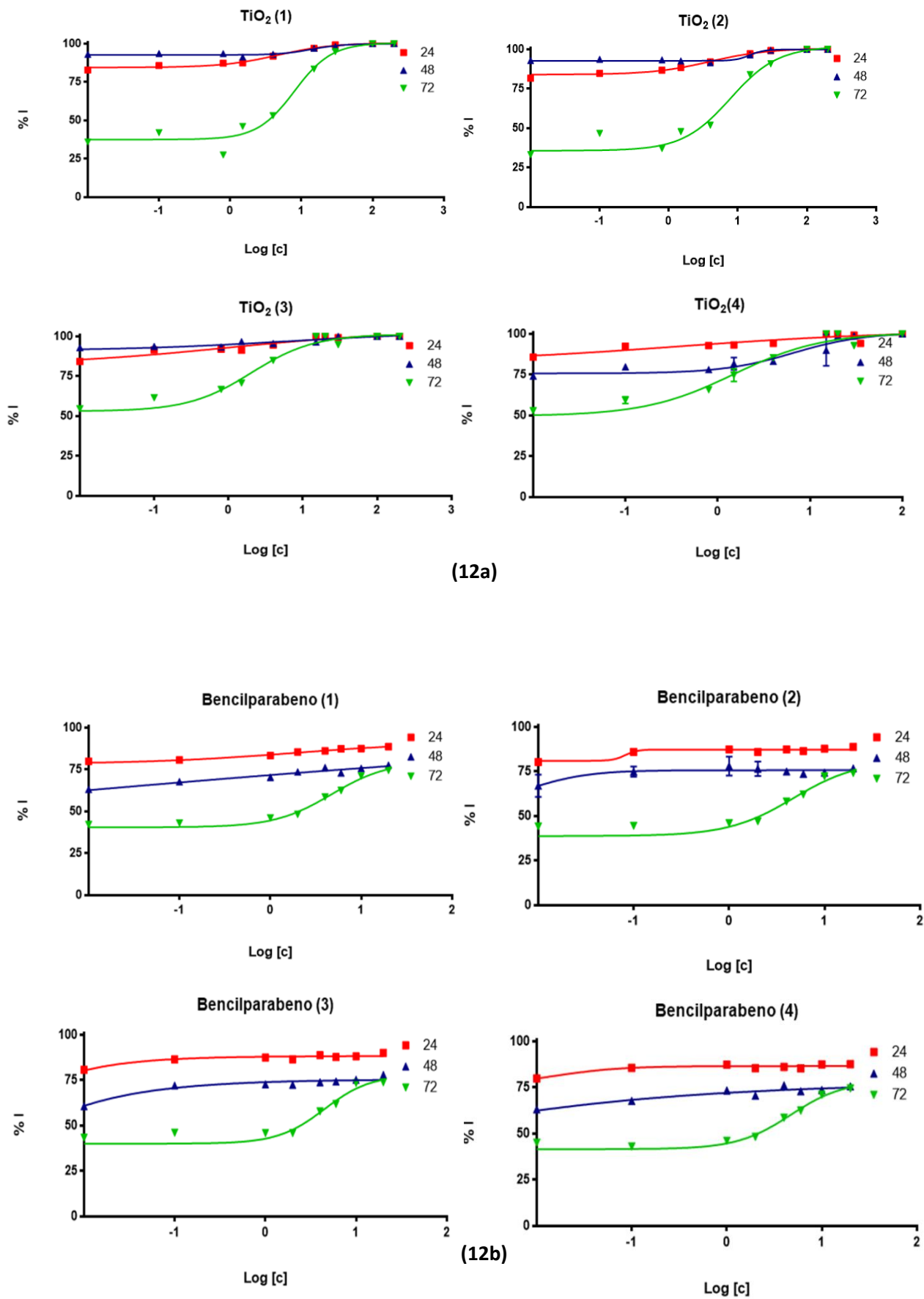


Figura 12. Resultados de Toxicidad para 24, 48 y 72 h para TiO₂ (a) y para BzP (b).

9.3. Estudios de Toxicidad con *Daphnia magna* para mezclas binarias.

Teniendo en cuenta la más que probable presencia simultánea de residuos de compuestos químicos presentes en los PCPs en los ecosistemas acuáticos, se llevaron a cabo bioensayos de toxicidad de mezclas binarias constituidas por TiO_2 , BzP y BP3 con *Daphnia magna*.

Para este ensayo el BP3 fue seleccionado teniendo en cuenta, que un filtro UV orgánico de los más utilizados. El TiO_2 , que es un filtro UV inorgánico, se suele encontrar como nanopartículas en las formulaciones más novedosas. En el bioensayo se incluyó también BzP puesto todos los productos necesitan algún tipo de conservante.

Los resultados de toxicidad obtenidos de la exposición de *Daphnia magna* a los compuestos individuales, se utilizaron para conocer la toxicidad de la mezcla suponiendo que la toxicidad es aditiva. El comportamiento de las mezclas binarias de los compuestos estudiados se muestra en la Figura 13, donde se representa el porcentaje de inhibición y las concentraciones de cada compuesto.

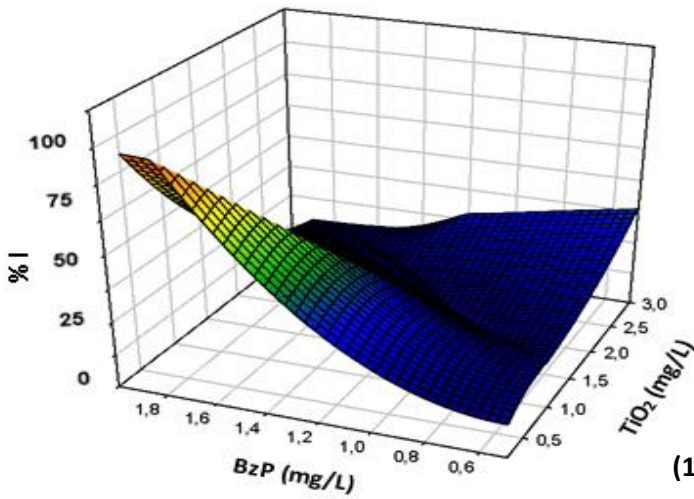
Como observamos en la Figura (13a) y la Figura (13b) la suma de los compuestos es mayor que la adición, entonces diremos que se está produciendo un efecto sinérgico potenciando la toxicidad, es decir los dos compuestos afectan negativamente al organismo. Esto sugiere que el TiO_2 con el BzP y también con BP3, tiene un efecto más peligroso que la de los compuestos individuales.

En las mezclas binarias de TiO_2 -BzP y TiO_2 -BP3 se observó una inmovilización apreciable de los individuos expuestos durante el tiempo de ejecución de los bioensayos. Esto sugiere que las nanopartículas de TiO_2 en combinación con otros compuestos tiene un efecto aún más peligroso que cuando actúa individualmente, esto indica un efecto sinérgico del TiO_2 con BzP y BP3.

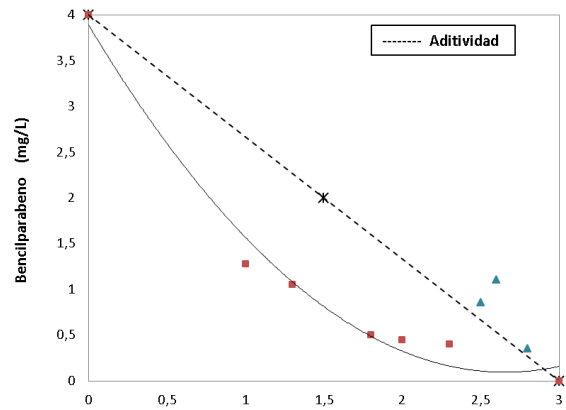
Como observamos en la Figura (13c), la mezcla de BzP y la BP3 produce una mortalidad reducida, se observa un efecto reducido a lo esperado por la adición, observamos entonces un efecto antagónico, es decir, los dos compuestos están compitiendo por los centros activos de la célula que causan la mortalidad.

Debido a ellos se aconsejaría en un futuro realizar más estudios para confirmar que dicho comportamiento se produce en las tres mezclas binarias.

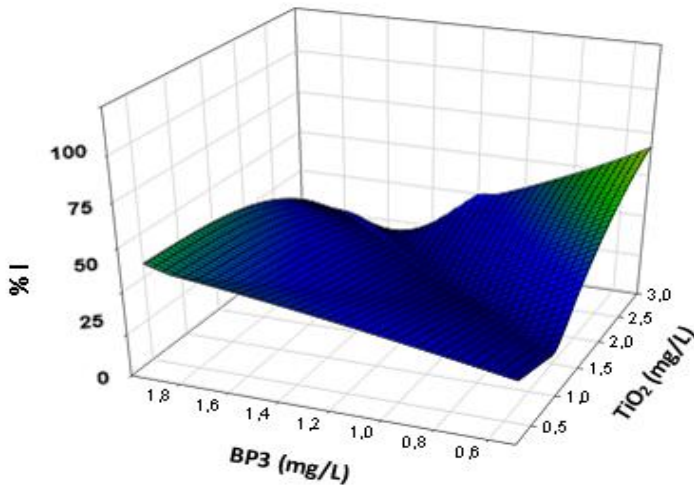
TiO₂-BzP



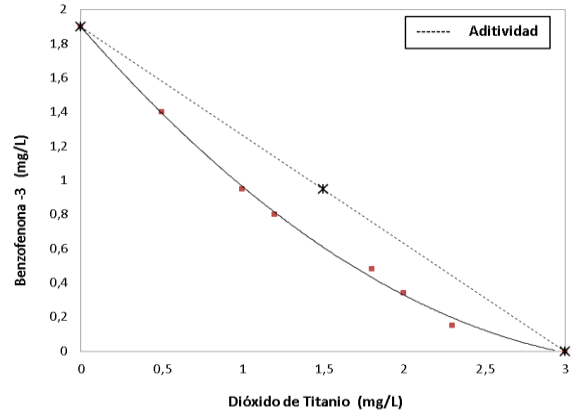
(13a)



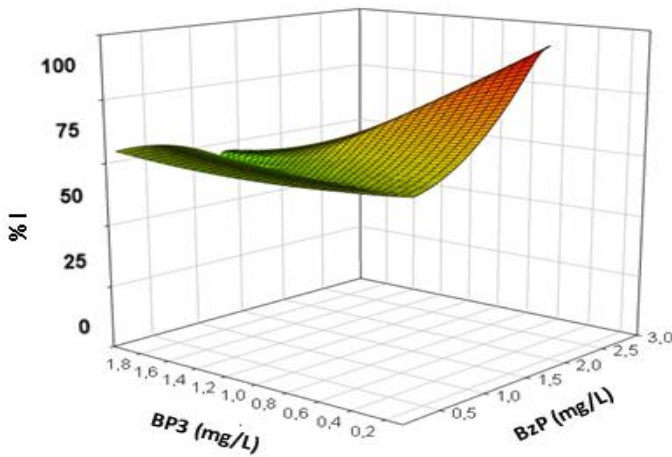
TiO₂-BP3



(13b)



BzP-BP3



(13c)

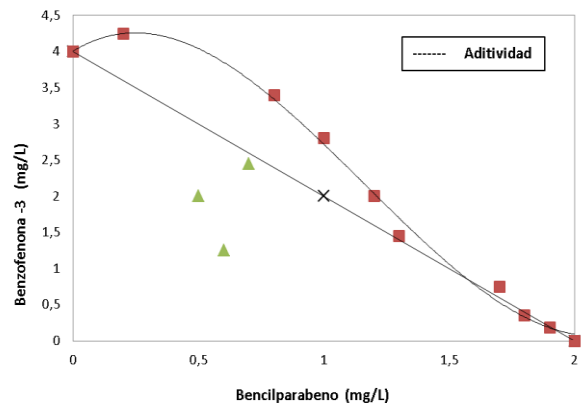


Figura 13. Mezcla TiO₂-BzP y % inhibición la mezcla (a), mezcla TiO₂-BP3 y % inhibición de la mezcla (b) y mezcla de BzP-BP3 y % inhibición de la mezcla (c).

10. Conclusiones.

Con el fin de determinar la toxicidad para algunos ingredientes más utilizados para formulaciones de productos de cuidado personal, como son los filtros UV y los conservantes, se utilizaron dos organismos acuáticos *Daphnia magna* y alga *Phaeodactylum tricornutum*.

Los valores de EC_{50} determinados para los filtros UV y para los conservantes están en el rango de mg/L, donde se observaron toxicidades altas en el caso del BzP y TiO_2 , encontrándose el menor valor de toxicidad para el MeP.

Para el primer experimento con *Daphnia magna* se obtuvieron para dos de los compuestos, bencilparabeno y dióxido de titanio las mayores toxicidades del estudio con valores de EC_{50} de 1,354 mg/L y 3,09 mg/L respectivamente. Para metilparabeno se obtuvo un valor de EC_{50} de 32,51 mg/L, comparable con ensayos anteriores⁷², demostrando toxicidad para este organismo en un tiempo de exposición de 48 h.

Para el segundo experimento con algas marinas *Phaeodactylum tricornutum*, se demuestra la resistencia de este organismo tanto para el TiO_2 dióxido de titanio como para el BzP, para la exposición a 48 horas a estos dos compuestos.

Para el TiO_2 se observa que la inhibición máxima alcanzada a las 48 horas es del 78% y a las 72 horas la inhibición máxima es del 60% y para bencilparabeno es de 74% en 48 horas y 40% para 72 horas.

Para el bioensayo de mezclas binarias con *Daphnia magna* se observó el mayor efecto tóxico para TiO_2 cuando se combina con BzP y BP3. En este sentido, los resultados de este estudio indican que las mezclas de estos compuestos en algunos casos pueden ser superiores que la simple suma de las toxicidades de cada compuesto individualmente. En otros casos puede ocurrir lo opuesto tal y como se observa para la mezcla BzP-BP3.

**Agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad su subvención mediante el
proyecto SOLAR (Ref. 2015801004).**

11. Referencias Bibliográficas.

1. Nieto A, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E (2009) Determination Of Personal Care Products In Sewage Sludge By Pressurized Liquid Extraction And Ultra-High Performance Liquid 24 Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal Of Chromatography A* 1216 (30):5619-5625.
2. Boberg Julie, Taxvig Camilla, Christiansen Sofie, Has Ulla (2010) Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology* 30(2010) 301-312.
3. Edwards Mónica, Gil Daniel, Vilches Amparo y Praia João, La atención a la situación del mundo en la educación científica, Universidade de Porto. Portugal. *Enseñanza de las Ciencias*, 22(1), 47-63 (2004).
4. Stuart Marianne, Lapworth Dan, Crane Emily, Hart Alwyn, Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater, British Geological Survey, OX10 8BB, UK.
5. Caliman Florentina Anca, Gavrilesu Maria, Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review, , Faculty of Chemical Engineering and Environmental Protection, Gheorghe.
6. Barceló, Damiá y López, María J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales- CSIC. 2007.
7. Gil Miriam Janet, Soto Adriana María, Usma Jorge Iván, Gutiérrez Omar Darío; Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos, *Producción + Limpia*, Julio - Diciembre de 2012. Vol.7, No.2 52-73.
8. TERZIĆ, Senka et al Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the total environment*. 2008. Vol. 399. p. 66-67

9. Damstra Terri, Barlow Sue, Bergman Aake, Kavlock Robert, Van Der Kraak Glen, Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization 2002, Geneva, Switzerland.
10. Valle-Sistac Jennifer, Molins-Delgado Daniel, Díaz Marta, Ibáñez Lourdes, Barceló Damià, Díaz-Cruz M. Silvia. Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4.
11. Prusakiewicz Jeffery J., Harville Heather M., Zhang Yanhua, Ackermann Chrisita, Voorman Richard L., Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben estrogenic effects Department of Pharmacokinetics, Dynamics, and Metabolism, Pfizer Global Research and Development, 2008.
12. Darbre Harvey PD, Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks PW. 2008 Jul. 28(5), 561-78.
13. Schlumpf, Ma. et al. 2004. "Endocrine Activity and Developmental Toxicity of Cosmetic UV Filters--an Update." *Toxicology* 205(1-2): 113-22. (May 8, 2015).
14. Daughton, Christian. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ Impact Asses Rev.* 2004. Vol. 24. p. 711-32.
15. Daughton Christian G. and Ternes Thomas A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? Environmental Sciences Division, U.S.
16. Becerril, José. Contaminantes Emergentes en el Agua. En: *Revista Digital Universitaria.* 2009. Vol. 10. N° 8. p. 1-7.
17. Meador, J. 2006. "Justificación Y Procedimientos Para El Uso Del Enfoque de Los Residuos de Los Tejidos de La Toxicidad Directrices Para La Evaluación Y

- Determinación de Tejido, Agua Y Calidad de Los Sedimentos Para Acuática Organismos.” Evaluación Del Riesgo Humano Y Ecológico, 12 (6): 1018–73.
18. Shenker, M., D. Harush, J. Ben - Ari, and B. Chefetz. 2011. “Uptake of Carbamazepine by Cucumber Plants-a Case Study Related to Irrigation with Reclaimed Wastewater.” *Chemosphere* 82 (6): 905–10.
 19. J. Pontolillo, R. Eganhouse. 2001. “The Search for Reliable Aqueous Solubility (Sw) and Octanol-Water Partition Coefficient (Kow) Data for Hydrophobic Organic Compounds: DDT and DDE as a Case Study.” Department of the Interior, US Geological Survey Reston, Virginia, US.
 20. Zenker, A. et al. 2014. “Bioaccumulation and Biomagnification Potential of Pharmaceuticals with a Focus to the Aquatic Environment.” 133: 378–87.
 21. Gray, J. S. 2002. *Marine Pollution Bulletin Biomagnification in Marine Systems: The Perspective of an Ecologist*.
 22. Bruggeman, W.A. et al. 1984. “Bioaccumulation of Super-Lipophilic Chemicals in Fish.” *Toxicological & Environmental Chemistry* 7 (3): 173–89.
 23. Thomann, R. V. 1989. “Bioaccumulation Model of Organic Chemical Distribution in Aquatic Food Chains.” *Environmental science & technology* 23 (6): 699–707.
 24. Cosmetic Design Europe [http://www.cosmeticsdesign-europe.com/Market-Trends/Sun-care-demand-boosts-TiO₂-nanomaterial-market](http://www.cosmeticsdesign-europe.com/Market-Trends/Sun-care-demand-boosts-TiO2-nanomaterial-market).
 25. Tolls J, Berger H, Klenk A, Meyberg M, Beiersdorf AG, Müller R, Rettinger K, Steber J (2009) Environmental Safety Aspects Of Personal Care Products-A European Perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (12):2485-2489.
 26. Barnthouse L. Mackay D., Integrated risk assessment of household chemicals and consumer products: addressing concerns about triclosan 2010 Jul, 6 (3):390-2, 10.1002/73.

27. Bruggeman, W.A. et al. 1984. "Bioaccumulation of Super-Lipophilic Chemicals in Fish." *Toxicological & Environmental Chemistry* 7 (3): 173–89.
28. Thomann, R. V. 1989. "Bioaccumulation Model of Organic Chemical Distribution in Aquatic Food Chains." *Environmental science & technology* 23 (6): 699–707.
29. Gago-Ferrero, P., M. Silvia Díaz-Cruz, and D. Barceló. 2013. "Multi-Residue Method for Trace Level Determination of UV Filters in Fish Based on Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Quadrupole-Linear Ion Trap-Mass Spectrometry." *Journal of chromatography. A* 1286: 93–101.
30. Liardet, S. y otros. 2001. "Protection against Pyrimidine Dimers, p53, and 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Expression in Ultraviolet-Irradiated Human Skin by Sunscreens: Difference between UVB & Plus; UVA and UVB Alone Sunscreens. 1." *Journal of investigative dermatology* 17(6): 1437–41.
31. Shan Zhu Xiao, Chan Yung, Chen Yongsheng. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. 2009.
32. Rinke K. Hund, Simon, M., Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and Daphnids, *Health and Environmental Research Online* 2006.
33. Molins-Delgado Daniel, Gago-Ferrero Pablo, Díaz-Cruz Silvia M., Barceló Damiá. Single and joint ecotoxicity data estimation of organic UV filters and nanomaterials toward selected aquatic organisms .Urban ground water risk assessment.
34. Catalaf Antonia M., Ye Xiaoyun, Wong Lee-Yang, Bishop Amber M., and Needham Larry L. Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006 *Environ Health Perspect.* 2010 May; 118(5): 679–685.
35. Colvin, Vicky. "The potential environmental impact of engineered nanomaterials", *Nature Biotechnology* 21, 2003 (EU).

36. Wang Yixiang, Zhu Xiaoshan, Lao Yongmin, Lv Xiaohui, Tao Yi, Huang Boming, Wang Jiangxin, Zhou Jin, Cai Zhonghua, TiO₂ nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*, 2016.
37. Heinlaan Margit, Ivask Angela, Blinova Irina, Dubourguier Henri- Charles, Kahru Anne. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*.
38. Lovern, Sarah y Rebecca Klaper. "Daphnia Magna Mortality When Exposed to Titanium Dioxide and Fullerene (C60) Nanoparticles", en *Environmental Toxicology and Chemistry* 4, Vol 25, 2006 (EU).
39. Díaz-Cruz, M.S., M. Llorca, and D. Barceló. 2008. "Organic UV Filters and The Photodegradates, Metabolites and Disinfection by-Products in the Aquatic Environment." *Trends in Analytical Chemistry* Vol. 27(No. 10): 873–87.
40. Calafat, A. M. et al. 2008. "Concentrations of the Sunscreen Agent Benzophenone-3 in Residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004." *Environmental Health Perspectives*, 116: 893–97.
41. Kunisue, T. et al. 2012. "Urinary Concentrations of Benzophenone-Type UV Filters in U.S. Women and Their Association with Endometriosis." *Environmental Science Technology* 46(8): 4624–32. <http://www.scopus.com/inward/record.url> (May 8, 2015).
42. León, Z. et al. 2010. "Solid-Phase Extraction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analytical Method for the Determination of 2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenone and Its Metabolites in Both Human Urine and Semen." *Analytical Bioanalytical Chemistry* 398(2): 831–43. <http://www.scopus.com/inward/record.url> (May 8, 2015).
43. N. Blüthgen, S. Zucchi, K. Fent, Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263 (2012) 184.

44. T. Kunisue, Z. Chen, G.M. Buck Louis, R. Sundaram, M.L. Hediger, L. Sun, et al., Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 4624–4632.
45. T. Zhang, H. Sun, X. Qin, Q. Wu, Y. Zhang, J. Ma, et al., Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood, *Sci. Total Environ.* 461-462 (2013) 49–55.
46. H.A. Garcia, C.M. Hoffman, K.A. Kinney, D.F. Lawler, Laccase-catalyzed oxidation of oxybenzone in municipal wastewater primary effluent, *Water Res.* 45 (2011) 1921–32.
47. S. Kim, K. Choi, Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review, *Environ. Int.* 70 (2014) 143–57.
48. Cosmetic Information www.cosmeticinfo.org.
49. Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J. and Pope G.S. Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours.
50. Pavlakin Maria D., Pereira Ricardo, Loureiro Susana, Soares Amadeu M.V.M., Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna* *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(2011)99–110.
51. D. Błędzka, M. Gmurek, M. Gryglik, M. Olak, J.S. Miller, S. Ledakowicz, Photodegradation and advanced oxidation of endocrine disruptors in aqueous solutions, *Catal. Today.* 151 (2010) 125–130.
52. TERNES, T. A.; Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research.* 2003. Vol.37, N° 8, p. 1976-1982.
53. S. Kim, K. Choi, Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review, *Environ. Int.* 70 (2014) 143–57.

54. Golden R, Gandy J, Vollmer G (2005) A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit Rev Toxicol* 35 (5):435-458. 10.1080/10408440490920104.
55. In-Cosmetic global. www.in-cosmeticsglobal.com.
56. L'Oreal Recherche <http://www.loreal.fr/recherche---innovation.com>

12. Anexos.

ANEXO I. LISTADO DE ACRÓNIMOS.

BP: Benzofenona.

BP1: Benzofenona-1.

BP2: Benzofenona-2.

BP3: Benzofenona-3.

BzP: bencilparabeno.

CaCl₂: Cloruro de Calcio.

CE: Contaminantes emergentes.

CPR: Reglamento de Productos Cosméticos

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DMA: Directiva Marco del Agua

DO: Densidad Óptica.

EC₅₀: Concentración Efectiva Media.

EDC: Compuestos Disruptores Endocrinos.

EDARs: Estaciones depuradoras de aguas residuales

EQSD: Environmental Quality Standards Directive.

EtP: etilparabeno

H₃BO₃: Acido Trioxobórico.

KCl: Cloruro de Potasio.

K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua.

MeP: metilparabeno

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

MgSO₄: Sulfato de Magnesio

NaCl: Cloruro de Sodio.

NaHCO₃: Bicarbonato de Sodio.

nd: No detectado

PB: parabeno.

PABA: Ácido p-aminobenzoico.

PCP: Producto para el cuidado personal

PrP: propilparabeno

SPF: Factor de Protección Solar

TiO₂: Dióxido de titanio.

TiO₂ NPs: Nanopartículas de dióxido de titanio.

UE: Unión Europea

UV: Ultravioleta.

UVA: Ultravioleta de onda larga (320-400 nm).

UVB: Ultravioleta de onda media (290-320 nm).

USA: Estados Unidos.

ZnO: Óxido de Zinc.