

# Biodegradación y Ecotoxicidad de los Etoxilatos de Alcohol Ramificados: Aplicación del Modelo Lipídico Objetivo y las Implicaciones para la Clasificación Ambiental

Gail E. Bragin<sup>1†</sup>  · Craig Warren Davis<sup>1†</sup> · Ming H. Kung<sup>2</sup> · Barbara A. Kelley<sup>1</sup> · Cary A. Sutherland<sup>1</sup> · Mark A. Lampi<sup>1</sup>

Recibido: 17 de abril de 2019 / Revisado: 26 septiembre 2019 / Aceptado: 27 de septiembre de 2019

© 2019 Los Autores. Revista de Surfactantes y Detergentes publicada por Wiley Periodicals, Inc. en nombre de American Oil Chemists' Society

**Abstracto** Con el advenimiento de las regulaciones globales para un detergente más seguro y un énfasis en el cambio hacia formulaciones más respetuosas con el entorno ambiental, el perfil ambiental de las químicas surfactantes se ha movido a la vanguardia de la formulación y el diseño de productos. Las dos piedras angulares de los perfiles ambientales tensioactivos son la capacidad de biodegradarse en el medio natural y el perfil de peligro ecológico. Los objetivos de este artículo son describir datos de biodegradación y toxicidad acuática para una serie de surfactantes de etoxilato de oxoalcohol ramificados (AEO); aplicar el modelo lipídico objetivo (TLM) para derivar concentraciones de umbral de peligro basadas en modelos (HC5) de AEO; y, por último, determinar con precisión las clasificaciones acuáticas para los surfactantes AEO para su uso en marcos de clasificación regulatoria. La biodegradación da como resultado un alto nivel de biodegradabilidad de los AEO ramificados, con oxo-alcoholes ricos en C8-C13 con 1-20 mol de etoxilato que cumplen con los criterios fácilmente biodegradables. Los resultados de pruebas de toxicidad aguda y crónica indicaron toxicidad acuática comparable o menor frente a estructuras lineales de AEO previamente reportado en la literatura. El modelo

TLM, aplicado a priori, dio lugar a un buen acuerdo con datos agudos de toxicidad (RMSE = 0,49) y es comparable a los errores de raíz cuadrada (RMSE) previamente determinados para otros productos químicos narcóticos (RMSE = 0,46–0,57). Los errores de modelo para los invertebrados y los peces eran menores que los de las algas, y el TLM pueda sobrepredecir sistemáticamente la clasificación aguda y crónica de dos de las siete AEO ramificadas. Además, se determinó que los valores HC5 predichos por TLM eran suficientemente conservadores, y el 100% de los datos crónicos observados (N = 79) estaban por encima de los valores umbral hc5, proporcionando una herramienta útil para la evaluación del riesgo de la OEA.

**Palabras clave** Alcohol etoxilatos Surfactante Toxicidad acuática Biodegradación Objetivo lipídico TLM

J Surfact Deterg (2020) 23: 383–403.

## Introducción

Los etoxilatos de alcohol (AEO) son moléculas de surfactantes neutros, ampliamente utilizadas tanto en aplicaciones de productos industriales como de consumo (Environment Canada, 2013). Son el resultado de la reacción química de alcoholes grasos de diversos orígenes y óxido de etileno. El resultado es una molécula surfactante con porciones hidrofóbicas (hidrofoba de alcohol alquilo graso) e hidrofílicas (cadenas de óxido de etileno). A menudo, los productos comerciales son mezclas complejas con una gama de longitudes de cadena de alquilación y etoxilato (P&G, 2015; Sasol, 2018; Shell, 2018). generalmente, los AEO tienen la fórmula R- (OCC)n-OH, donde R representa la cadena de alquilo de alcohol graso y n representa el grado de etoxilación de la molécula. Mientras, tanto la longitud de la cadena, R, y el grado de etoxilación, n, varían considerablemente entre los productos comerciales, las gamas comunes para AEO son R = 10–17 y n = 0-18 (Belanger et al., 2006; Medio Ambiente Canadá, 2013).

**Información de apoyo** la información de apoyo adicional puede encontrarse en línea en la sección Información de apoyo al final del artículo.

✉ Gail E. Bragin  
gail.e.bragin@exxonmobil.com

<sup>1</sup> ExxonMobil Biomedical Sciences, Annandale, NJ, USA

<sup>2</sup> ExxonMobil Chemical Company, Houston, TX, USA

<sup>†</sup>Estos autores contribuyeron por igual a esta obra.

Se trata de un artículo de acceso abierto bajo los términos de la Licencia de Creative Commons Attribution, que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea citada correctamente.

$R = 10\text{--}17$  y  $n = 0\text{--}18$  (Belanger et al., 2006; Environment Canada, 2013). Las propiedades surfactantes únicas de estos AEO junto con su gran peso molecular y variabilidad en la composición a menudo resultan en grandes incertidumbres en torno a la estimación de sus propiedades fisicoquímicas (es decir, KOW)y, consecuentemente, su destino final y peligro potencial en el medio acuático.

Desde la adopción generalizada de los primeros surfactantes químicos a mediados del siglo XX, el destino ambiental y los efectos de estas sustancias han sido una propiedad clave de desempeño. En los últimos años, los vínculos ambientales apropiados de los surfactantes no iónicos han sido de creciente interés para los reguladores y los usuarios intermedios (Brown, 1995; Lacasse y Baumann, 2012; Lassen et al., 2013; Wenzel et al., 2004). Por consiguiente, se ha hecho mayor hincapié en la importancia de la biodegradabilidad de los surfactantes como dimensión básica del rendimiento. Esto ha dado lugar a una gran proliferación de esfuerzos voluntarios y reglamentarios de la industria para minimizar el uso y la liberación de sustancias que pueden persistir en el medio ambiente (Lacasse y Baumann, 2012, Lassen et al., 2013, Wenzel et al., 2004). El Reglamento sobre detergentes más seguros (CE, 2005) de la Unión Europea (UE), que fue un ensayo estandarizado que exigía la biodegradabilidad primaria (biotransformación) y definitiva (mineralización) y la aplicación de requisitos estrictos para las aplicaciones de consumo e industriales, fue fundamental para establecer características de rendimiento perjudiciales de los surfactantes que han afectado a la industria mundial de surfactantes. Además, la adopción generalizada del Sistema Armonizado Mundial (ONU, 2017) de clasificación y etiquetado ha aumentado la demanda de surfactantes con perfiles de seguridad favorables.

### Biodegradación

Comprender la biodegradabilidad de los productos químicos industriales es un componente clave requerido por muchos organismos reguladores aliados (por ejemplo, la Agencia Europea de Productos Químicos [ECHA], Environment Canada, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos [USEPA], etc.). El uso de las series 301 y 310 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y 310 de pruebas de biodegradabilidad listas se consideran la norma para fines de cribado (OCDE, 1992b, OCDE, 2014). Estas pruebas generalmente se consideran de naturaleza conservadora. Como tal, un resultado positivo en una de estas pruebas se considera "indicativo de biodegradación rápida y definitiva en la mayoría de los ambientes." Estas pruebas de cribado fueron diseñadas de manera que los resultados positivos serían inequívocos, y en tales casos, normalmente no sería necesaria una investigación adicional de la biodegradabilidad de los efectos químicos o ambientales de cualquier producto de transformación (ECHA, 2017).

Los informes previos sobre los AEO altamente ramificados han caracterizado constantemente una relación inversa entre el grado de ramificación y la tasa de biodegradación (Dorn et al., 1993;

Kravetz et al., 1991; Marcomini et al., 2000a; Marcomini et al., 2000b; Mausner et al., 1969). Es fundamental apreciar que las pruebas de detección de biodegradación (serie OCDE 301) se consideran estrictas y su interpretación, conservadora. Las pruebas de biodegradabilidad listas son lo suficientemente estrictas como para que se asuma la biodegradación rápida y completa de los componentes en ambientes acuáticos (OCDE, 1992b). Es bien sabido que las pruebas de biodegradabilidad listas pueden ser variables, lo que resulta en falsos negativos. Esta variabilidad puede atribuirse a varios factores; quizás la más influyente es la variabilidad en la fuente del inóculo, la población y la proporción de masas de inóculo (Gartiser et al., 2017). Por lo tanto, los resultados "positivos" que cumplen con los criterios se consideran pruebas suficientes de biodegradabilidad y generalmente deben obtener resultados negativos (OCDE, 1992b).

El grado de ramificación de múltiples clases de los surfactantes se ha asociado con una biodegradabilidad más lenta o deficiente en relación con los análogos lineales en varios métodos de prueba de biodegradabilidad definitivos. Por el contrario, los informes publicados han demostrado efectos favorables de la ramificación de la toxicidad ambiental (Dorn et al., 1993; Kaluza y Taeger, 1996; Kravetz et al., 1991).

### Evaluación de riesgos de los AEO

El destino ecológico y el peligro acuático de los surfactantes han sido bien estudiados en las últimas décadas. Los primeros esfuerzos se centraron predominantemente en las clases de surfactantes iónicos (es decir, sulfonato lineal de alquilo-benceno [LAS]) (Feijtel et al., 1995; Rapaport y Eckhoff, 1990; Waters y Feijtel, 1995). Los trabajos posteriores se han centrado en los AEO y sus perfiles de riesgo relativo, en comparación con otras clases de surfactantes, debido a los altos volúmenes de producción y el uso directo de escenarios para aplicaciones de consumo (Environment Canada, 2000; EPA, 2005; Goyer et al., 1981; Knepper et al., 2003; Pequeño, 1977; Routledge y Sumpter, 1996; Servos, 1999; Talmage, 1994; van de Plassche et al., 1999). Una evaluación de riesgos más reciente de Belanger et al. distribuciones derivadas de sensibilidad a especies (SSD) y, en última instancia, HC5 (concentración brumosa-ardiente protectora del 95% de las especies) valores de thresh-old basados en datos de toxicidad crónica para mezclas y homólogos de OEA utilizando 17 especies y 60 pruebas de ecotoxicidad (Belanger et al., 2006). Estos valores de HC5 se compararon con las concentraciones típicas de los AEO en el medio ambiente en América del Norte y Europa, concluyendo que existían bajos niveles de riesgo para los ambientes acuáticos basados en estos criterios derivados. Si bien la evaluación del riesgo de Belanger y otros fue exhaustiva, no se incluyeron los AEO ramificados y, por lo tanto, sigue habiendo cierta incertidumbre en cuanto al riesgo potencial para el medio acuático. A obstáculo significativo para derivar criterios hc5 de datos crónicos experimentales (como se utiliza en la Evaluación del riesgo de Belanger et al. 2006) para nuevas sustancias o mezclas y que requieren un número significativo de especies para desarrollar

una distribución de sensibilidad para permitir la extrapolación hasta el nivel del 5% (HC5) de protección de especies (Aldenberg y Jaworska, 2000; Posthuma et al., 2001). Alternativamente, los criterios HC5 pueden derivarse (computacionalmente) para los productos químicos que exhiben modos de acción tóxicos "narcóticos" no específicos utilizando el modelo lipídico objetivo (TLM) desarrollado por Di Toro et al. (Di Toro y McGrath, 2000; Di Toro et al., 2000).

### Modelo Lipídico Objetivo

El TLM es un modelo de relación de actividad-estructura cuantitativa (QSAR), que relaciona la toxicidad observada (es decir, la concentración letal mediana-LC50) con el coeficiente de partición de octanol-agua de una sustancia. Hay varias suposiciones clave sobre las que se construye el marco de trabajo del modelo TLM: (1) la fracción lipídica del organismo es el lugar de acción pertinente para los productos químicos narcóticos, (2) la concentración crítica de un producto químico necesario para exhibir un efecto tóxico (la carga corporal crítica) expresado en [ $\mu\text{mol g}^{-1}$  lípido] es específico del organismo e independiente de la estructura química, y (3) el comportamiento de partición de sustancias químicas estupefacientes entre lípidos y agua se describe por el comportamiento de partición de octanol-agua a través de una "pendiente de narcosis" universal y es independiente del organismo (Di Toro y McGrath, 2000; Di Toro et al., 2000). El TLM se derivó originalmente para un conjunto de sustancias químicas narcóticas conocidas ( $n = 140$ ) y organismos de prueba ( $sp = 33$ ) (Di Toro y McGrath, 2000) pero desde entonces se ha ampliado y revisado para incluir especies adicionales (McGrath et al., 2004), clases adicionales de productos petrolíferos (es decir, componentes de la gasolina, hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos) (McGrath et al., 2005; McGrath y Di Toro, 2009), y compartimentos ambientales adicionales (es decir, suelo y sedimentos) (Redman et al. 2014b). El TLM constituye la base de las herramientas PET-ROTOX y PETRORISK, ampliamente utilizadas en evaluaciones de riesgos y exposiciones para productos de hidrocarburos y disolventes de hidrocarburos en América del Norte y la Unión Europea (UE) (Redman et al., 2012; Redman et al., 2014a; Redman et al., 2017).

Trabajos anteriores han demostrado que el modo de acción de los efectos ecotoxicológicos de los surfactantes de los AEO se consideran narcóticos (Escher et al., 2002; Escher y Hermens, 2002; Roberts, 1991; Roberts y Marshall, 1995), y Droge et al. (2008, 2009) han demostrado que la toxicidad de los sedimentos puede predecirse a partir de toxicidad acuosa basada en la teoría de partición de equilibrio si se tienen en cuenta los descriptores correctos de sorbato de los AEO y las propiedades sorbentes del sedimento. En consecuencia, es posible aplicar el marco del TLM a la toxicidad acuática de los AEO y derivar criterios hc5 basados en TLM sin necesidad de amplios programas de pruebas de toxicidad crónica. Hasta la fecha, no se ha intentado validar y aplicar el TLM para predecir la toxicidad acuática de los AEO. Esto puede deberse al hecho de que hay limitaciones significativas

a la derivación de datos fiables de registro experimental ( $K_{OW}$ ) para surfactantes (Hodges et al., 2019), lo que dio lugar a incertidumbres sustanciales en las toxicidades acuáticas predichas de las mezclas de homólogos únicos y surfactantes comerciales.

Este artículo tiene como objetivo abordar varios objetivos específicos: en primer lugar, presenta datos de biodegradación y toxicidad acuática inéditos (algunos de los cuales han sido reportados previamente en conferencias y en informes de la empresa (Markarian et al., 1989, 1990) para una serie de AEO ramificados, caracterizando las propiedades ambientales de surfactantes derivados de materias primas de alcohol altamente ramificadas. En segundo lugar, este artículo compara los datos de toxicidad acuática (incluidos los datos de alfabetización existentes para los homólogos únicos de la OEA, así como las mezclas comerciales) con los niveles predichos utilizando el TLM. Por último, este artículo evalúa los niveles de efectos de toxicidad acuática y los datos disponibles de biodegradación para los AEO dentro del texto con de la clasificación de peligros en el marco del GHS de las Naciones Unidas (Sistema Armonizado Mundialmente de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos).

### Procedimientos Experimentales

#### Etoxilatos de Alcohol

Los tensioactivos AEO se derivaron de oxo-alcoholes ramificados ricos en C8, C9, C10, C11 y C13. Los AEO eran productos comerciales o procesados, con distintos grados de etoxilación que oscilaban entre 1 y 20 mol de etoxilación (EO). A efectos comparativos, se presentan datos adicionales para los AEO derivados de un oxo-alcohol ramificado rico en C12 y una mezcla semilineal C13/C15, que ya no están disponibles comercialmente. Las características compositivas y químicas de estos alcoholes se presentan en el Cuadro 1. Las propiedades físicas y químicas estimadas para las sustancias etoxilatos asociadas se establecen previamente en la Tabla S1.

Datos estructurales, fisicoquímicos y toxicológicos para mezclas comerciales lineales adicionales de los AEO, así como homólogos de un solo componente, a partir de la literatura. Concretamente, se consideraron datos de evaluaciones de riesgos anteriores (Belanger et al., 2006), además de datos de sustancias utilizadas en la calibración y validación de modelos QSAR anteriores (Wind and Belanger, 2006; Wong et al., 1997). Los datos bibliográficos recogidos incluyen unos 100 puntos finales agudos y crónicos que abarcan 14 especies (tres peces, tres algas y ocho esporas de invertebrado), con sustancias que van desde la longitud de la cadena de alcohol C8 a C18, con 2-13 mol EO (Belanger et al., 2006; Morrall et al., 2003; Wind and Belanger, 2006; Wong et al., 1997). Para obtener una lista completa de productos químicos, puntos finales y datos fisicoquímicos, consulte la Tabla S2.

**Tabla 1** Características de los alcoholes y nivel de etoxilación de las sustancias de ensayo

Nombre de muestra; código	Número de carbono										Ramas/molec. promedio	Detalles principales isómeros/	Rango de EO
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
Ramificado rico en C8 oxo-alcohol; C8br	<0.1	3	92	5							1.59	Metil-1-heptanoles, dimetil-1-hexanoles. Materia: Hepteno (propieno/buteno dímero)	4–10
Ricos en C9 ramificados oxo-alcohol; C9br			3	77	19	1					1.88	Metil-1-octanoles, dimetil-1-heptanoles. Materia: Octeno (Rico en buteno dímero de olefina)	1–20
Rico en C10 ramificados oxo-alcohol; C10br				3	90	7					2.03	Dimetil-1-octanoles, trimetil-1 heptanoles. Materia: Noneno (recortador de propileno)	3–9
Rico en C11 ramificado oxo-alcohol; C11br				0	9	85	6				2.23	Dimetil-1-nonanoles, trimetil-1-octanoles. Materia: Decenos (recortador de propileno/buteno)	3–10
Rico en C12 ramificado oxo-alcohol; C12br					6	18	55	20	1		3.1	Trimetil-1-nonanoles, tetrametil-1-octanoles. Materia: Indecenos (recortador de propileno/buteno)	7–12
Rico en C13 ramificado oxo-alcohol; C13br						1	23	70	6		3.06	Trimetil-1-decanoles, tetrametil-1-nonanoles. Materia: Dodecenos	3–12
C13/15 semilineal oxo-alcohol #1; C1315 (a) #2; C1315 (b)								67		33	0.33	(tetrámero de propileno) Mezcla de C13 lineal y C15 alcoholes; ca. 33% metilo y ramificación etílica en $\alpha$ -Carbono Materia: C12/14 lineal a-Olefinas	7–12

### Pruebas de biodegradación

Las pruebas de biodegradabilidad preparadas definitivas siguieron a la pauta de prueba de respirometría manométrica 301F de la OCDE (OCDE 1992b). Se determinó una biodegradabilidad lista para 21 AEO ramificada. Todos los sistemas de prueba se colocaron en un respirómetro manométrico, fabricado por Coordinated Environmental Service, Ltd. (Kent, Reino Unido), que registró automáticamente la absorción de oxígeno. La biodegradación se basó en el consumo de oxígeno; la demanda teórica de oxígeno (ThOD) se calculó a partir de los resultados de un análisis elemental de la sustancia de ensayo. El benzoato de sodio se utilizó como control positivo. El inóculo de lodos frescos activados se obtuvo de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (Somerset-Raritan Valley Sewage Authority, Bridgewater, NJ, USA), seleccionada porque se ocupa predominantemente de aguas residuales municipales no industriales. El funcionamiento de temperatura en la planta varió estacionalmente, con rangos de 10–13 C en invierno, 14–17 C en primavera/otoño, y 22–25 C en verano. Los lodos activados frescos se obtuvieron 1 día antes del inicio de la prueba y se homogeneizaron en una licuadora durante 2 minutos a velocidades baja y media. Se le permitió reposar a la muestra homogeneizada de 30 min a 1,5 h, después de lo cual el sobrenadante fue decantado para evitar el arrastre de sólidos de lodo. La actividad microbiana del sobrenadante fue

determinada, utilizando un portaobjetos con inmersión Easicult®-TTC, para ser 105 a 106 CFU mL<sup>-1</sup>. Se añadió el sobrenadante de lodos microbianos a un volumen de carga del 1% al medio de prueba. El medio de prueba se preparó de acuerdo con la directriz y consistió en agua destilada en vidrio y sales minerales (tampón de fosfato, cloruro férrico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio). Los lodos activados de y medios de prueba, que se airearon durante 24 h con aire libre de dióxido de carbono, se añadieron a cada matraz respirómetro. Los recipientes de prueba fueron frascos de vidrio, colocados en un baño de agua y monitoreados electrónicamente por consumo de oxígeno. Se ejecutaron sistemas de prueba triplicados para cada sustancia de prueba, junto con control positivo y muestras en blanco. La concentración de sustancias de prueba osciló entre 20 y 50 mg (en un mínimo de 900 ml) para proporcionar al menos 50–100 mg de ThOD/L (rango de ThOD especificado por la guía de examen). Un estudio fue conducido utilizando varias concentraciones de C13br-7EO (14, 28, 57, y 111 mg ThOD/L) y C13br-12EO (28, 55, y 110 mg ThOD/L) para evaluar los efectos de la concentración en la biodegradación. Las sustancias se pesaron en filtros de fibra de vidrio y luego se colocaron en cada matraz de réplica individual para ayudar a la dispersión de la sustancia de prueba en el medio y para aumentar la biodisponibilidad a los organismos de prueba. La prueba de temperatura se mantuvo en 22 C  $\pm$  1 C (con algunas desviaciones menores como se indica en el Cuadro S3). Todos los recipientes de prueba se agitaron constantemente utilizando barras de agitación magnéticas (estándar para el 301F prueba;

prueba; tenga en cuenta que esto también puede aumentar la bio-accesibilidad de las fases de absorción tales como las paredes de vidrio). Los detalles sobre la información específica del estudio están en el Cuadro S3.

### Métodos de Prueba de bioacumulación

Se realizó un único estudio para evaluar el potencial de bioacumulación de una OEA derivada de oxo-alcohol ramificado rico en C11 con 3 mol de EO (C11br-3EO) en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. El estudio se realizó en 2005, pero siguió los procedimientos de prueba adoptados posteriormente en la guía de pruebas OCDE 305 para la bioacumulación de la exposición dietética en peces (OCDE, 2012). El estudio incluyó fases de captación de 10 días y depuración de 14 días. Durante la captación, los peces adolescentes (con 117 días de edad) fueron alimentados con un 3% de sus pesos corporales promedio por día con una dieta tratada (medida media de 527 mg kg<sup>-1</sup> sustancia de prueba) o sin tratar (control) (Finfish Starter, #1 desmoronarse—Zeigler Bros., Inc., Gardners, PA, EE.UU.). El alimento de los peces se aumentó a una concentración meta de 500 µg g<sup>-1</sup> añadiendo 55 µL de la sustancia de prueba a un total de 100 g de la dieta y agitando manualmente durante 1 minuto seguido de un agitado mecánico durante la noche. Durante el período de depuración, todos los peces fueron alimentados con la dieta no tratada. Las cámaras de ensayo eran acuarios de vidrio de 40 L equipados con tubos verticales de acero inoxidable; 31 L de agua para dilución se vertieron en las cámaras de prueba a una velocidad de 102–118 ml min<sup>-1</sup> usando una bomba peristáltica (con cinco a seis reemplazos de volumen al día<sup>-1</sup>; carga de organismo: 0,14 g de pescado por litro de agua de dilución al día). Las muestras de pescado fueron recogidas el día 10 de la fase de absorción y los días 1, 3, 7 y 14 de la fase de depuración. Debido al potencial de biotransformación rápida, los tractos gastrointestinales fueron retirados de los peces de muestra antes del análisis de tejidos. Este paso se tomó para asegurar que las mediciones de tejido reflejaran la sustancia absorbida y no el material de prueba que se asoció con la dieta en picos residuales en el intestino. Las muestras de pescado pendientes de extracción se almacenaron congeladas a -140 C. Los restos de de pescado (0,6 y 3 g) se colocaron en viales de vidrio de 20 ml, se extrajeron con 3 g de hidromatrix y se les permitió secar en una campana de humo durante la noche y se transfirieron a 11 células de extracción acelerada de disolventes (ASE) de 11 ml junto con 2 ml de metanol. El contenido de lípidos de pescado se midió 2 días antes (en la población en existencia) y al final de la fase de absorción.

### Pruebas de Toxicidad

En 1988–1990 se realizaron estudios de toxicidad acuática para C12br-7EO, C12br-7EO, C12br-7EO, C12br-12EO, C13br-12EO, C13br-7EO, C13br-12EO, C1315-7EO en el laboratorio de toxicidad acuática ubicado en East Millstone, NJ. Estos estudios siguieron las directrices estándar de prueba USEPA (EPA, 1987a, b, c; Horning y Weber, 1985). Más recientemente (2018), se realizaron pruebas agudas de toxicidad acuática para C10br-9EO, C13br-3EO y C13br-5EO en el laboratorio ubicado en Annandale, NJ, siguiendo las

directrices estándar de la OCDE (OCDE, 1992a; OCDE, 2004, 2011) y cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) de la OCDE, (1998). Las diferencias menores entre los detalles del estudio pueden atribuirse a las condiciones estándar de laboratorio en cualquiera de los sitios. La información específica del estudio (por ejemplo, concentraciones, calidad del agua, observaciones) se detalla en los cuadros S4 (agudo) S5 (crónico) y S6 (resultados analíticos).

Para todos los estudios, se preparó una solución de la sustancia en diluyente en un recipiente de vidrio de tamaño adecuado y se mezcló en una placa de agitación magnética con una barra de agitación recubierta con teflón® hasta que la sustancia de prueba se disolvió por completo, lo que generalmente tomaba entre 15 y 60 minutos. A continuación, el caldo se diluyó para preparar una serie geométrica (factor de 1,8–2,2) de cinco o seis soluciones de tratamiento más un control del agua de dilución. Todas las soluciones de tratamiento parecían claras sin evidencia de insolubilidad de sustancias. Las observaciones se realizaban diariamente, aunque muchos de los estudios incluían períodos de observación adicionales (por ejemplo, 3 h, 6 h).

*Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente *Selenastrum capricornutum*) fueron cultivados y probados usando Algal Nutrient Media (Miller et al., 1978). Todas las pruebas se iniciaron con células de algas (ca.  $1 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>) en la fase de registro de crecimiento, de cultivos de 4 a 5 días, y se realizaron en una cámara ambiental controlada por temperatura. Para pruebas conducidas en 1988–1990, las cámaras de prueba eran frascos de Erlenmeyer desechables, estériles, con policarbonato 125 ml de frascos que contenían 50 ml de la solución de prueba inoculada con tapones de espuma autoclavados; los frascos se colocaron aleatoriamente en una mesa de agitación giratoria (100 rpm). Las observaciones de efecto fueron obtenidas mediante Clorofila, una lectura de fluorescencia que se convirtió en números celulares utilizando una fórmula de regresión desarrollada a través de recuentos celulares hemacitómetro. La duración de la prueba fue de 96 h bajo luz blanca fría fluorescente continua a 4300 10% lux a 24 C 2 C. En 2018, los medios nutritivo de algas fueron modificados con 400 mg L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, añadido como fuente de carbono en un entorno de espacio libre no o mínimo. Las cámaras de ensayo eran frascos Erlenmeyer de vidrio de 50 ml con tapas de tornillo forradas de politetrafluoroetileno (PTFE), que contenían ca. 64 ml de solución de prueba y una barra de agitación recubierta de teflón®. La densidad celular de las algas se determinaba diariamente utilizando un hemacitómetro. Las cámaras de prueba se asignaban aleatoriamente diariamente en una placa de agitación magnética con multi-posicionamiento. Las pruebas se re-alizaron durante 72 h bajo luz fluorescente de color blanco frío continua a 4440–5920 lx a 23 C 2 C. La tasa de crecimiento relativo (EPA, 1987a) (basada en log<sub>10</sub>) o la tasa de crecimiento específico promedio (OCDE, 2011) (basada en ln) se calculó de acuerdo con las directrices de prueba respectivas, y se calculó la inhibición porcentual del control.

Para estudios de daphnid y peces realizados en 2018, El diluyente era "moderadamente duro" (80–100 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) o "duro" (>140 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) con agua reconstituida pre-parada con agua de pozo esterilizada por UV, desionizada (DI) y sales de grado reactivo (APHA, 2017). En estudios anteriores, el agua de dilución era una mezcla de laboratorio de agua de pozo filtrada y

agua de ósmosis inversa, cumpliendo con las mismas especulaciones de dureza que el agua reconstituída. Las pruebas se realizaron en un baño de agua o cámara ambiental con temperatura controlada, con un foto-periodo claro de 16:8 h (ca. 400-1100 lx). A menos que se indique lo contrario, las cámaras de prueba estaban cubiertas con una lámina de vidrio para minimizar la evaporación o la contaminación.

*Daphnia magna* se cultivaban internamente. Los neonatos (<24 h de edad) fueron asignados aleatoriamente a cámaras de prueba que se colocaron aleatoriamente en el área de prueba. Las pruebas se condujeron en 48 h a 20 C 2 C. Para pruebas realizadas en 1988-1990, las cámaras de ensayo fueron autoclavadas 400 vasos de vidrio mL que contenían 300 ml de solución de prueba. Se prepararon dos cámaras de réplica que contenían 10 daphnids cada una para cada tratamiento y el control. Para las pruebas de 2018, las cámaras de prueba fueron botellas de vidrio de 130 ml completamente llenas de solución (sin espacio para la cabeza), cerradas con una tapa forrada de PTFE. Cada tratamiento y control consistía en cuatro cámaras de réplica, cada una con cinco daphnids.

*Ceriodaphnia dubia* se cultivaban internamente. Los neonatos (<24 h de edad, liberados dentro de un período de 6 h) fueron asignados aleatoriamente a cámaras de prueba que se colocaron aleatoriamente en el área de prueba. Las pruebas de supervivencia y reproducción se llevaron a cabo durante 7 días a 25 C 1 C. El diluyente era agua de mezcla de laboratorio, que había envejecido durante 7 días y pinchado con YCT (levadura/hojas de cereales/sopa de trucha). Las cámaras de ensayo eran viales de centelleo de vidrio de 20 ml o vasos de polipropileno de 30 ml que contenían 15 ml de solución de ensayo. Diez cámaras replicantes que contenían un solo daphniid cada uno fueron preparados para cada tratamiento y el control. Después de la observación diaria y la enumeración de los jóvenes, los organismos padres fueron transferidos a la solución fresca y alimentados con  $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> de algas *P. subcapitata* y 0,1 ml de YCT. Hay dos diferencias notables entre la guía de examen de 1985 seguida para estos estudios y la versión actual. En primer lugar, la prueba se inició con neonatos recogidos de organismos padres separados, totalmente aleatorizados, mientras que en la versión actual, se seguiría un procedimiento de aleatorización en bloque (de modo que la descendencia de una sola hembra se distribuyen uniformemente entre los tratamientos). En segundo lugar, la prueba se finalizó en un plazo de 2 h de exactamente 7 días, mientras que la prueba actual finalizaría después de que al menos el 60% de los organismos de control produjeran su tercera cría o al final de 8 días, lo que ocurra primero. Estas actualizaciones de la guía de pruebas reducen la variabilidad dentro y entre los niveles de tratamiento.

Los menores de cabeza de grasa (*Pimephales promelas*) (7–22 semanas de edad, según el estudio) para pruebas de toxicidad aguda fueron obtenidos de organismos de investigación acuática, Hampton, New Hampshire (y aclimatados al agua de dilución durante al menos 14 días y para probar la temperatura al menos 7 días) o cultivados en el centro de pruebas. Se realizaron pruebas de toxicidad aguda durante 96 h a 22 C o 23 C 1 C. Para pruebas conducidas en 1988-1990, las cámaras de ensayo consistían en 5 L de agua de vidrio que contenían 2.0–4.1 L de solución de prueba, proporcionando una carga de organismo de 0.32-0.67 gL<sup>-1</sup>. Dos cámaras de

réplica Con 10 organismos (asignados aleatoriamente) cada uno fueron pre-paredo para cada tratamiento y su control. En 2018, las cámaras de ensayo consistían en frascos de vidrio de ca. 4 L que contenían solución de 3,8 L, cerrados con una tapa de tornillo de policarbonato, proporcionando una carga de organismo de 0,08-0,09 g L<sup>-1</sup>. Cada tratamiento y control consistía en dos cámaras de réplica, cada una conteniendo siete organismos. En 2018, los organismos se transfirieron a una solución fresca diariamente (renovación diaria), mientras que los estudios más antiguos eran estáticos (sin renovación de soluciones).

Para las pruebas de supervivencia larvaria y crecimiento (*P. promelas*), los organismos fueron cultivados en el centro de pruebas. Las larvas recién eclosionadas se distribuyeron aleatoria o secuencialmente para probar las cámaras. Las pruebas se realizaron durante 7 días en 25 C 2 C. Las cámaras de ensayo consistían en 400 beakers de polipropileno de 400 ml que contenían 250 ml de solución de prueba. Cuatro cámaras de réplica que contenían cinco organismos cada una fueron preparadas para cada tratamiento y el control. Los peces se alimentaban dos veces al día con nauplii de camarones salmuera de 24 horas de edad. En la observación diaria, las soluciones de prueba se renovaron mediante la sustitución de aproximadamente el 90% de la solución y la sustitución por una solución fresca. Al terminar, los peces fueron eutanasiados usando una solución de benzocaína, colocado (por réplica) en platos de papel de aluminio preweighed, se secaron en un horno de 100 C durante al menos 2 h, y luego se pesaron.

La trucha arco iris (*O. mykiss*) eran adolescentes de 6 a 10 semanas de edad obtenidos de Spring Creek Trout Hatchery, Lewistown, MT. Los peces fueron aclimatados al agua de dilución durante al menos 14 días y a probar la temperatura durante al menos 7 días. Las pruebas se realizaron durante las 96 h a las 12 C 1 C. Las cámaras de ensayo consistían en aquaria de vidrio de 8,5-19 L que contenía 6,0-7,5 L de solución de prueba. Se prepararon dos cámaras de réplica que contenían 10 organismos (asignados aleatoriamente) cada una para cada tratamiento y control.

El protocolo y los procedimientos usados fueron revisados y aprobados éticamente por el coordinador de uso animal del laboratorio (2005-2018) o director de laboratorio (1988-1990). Todos los peces fueron tratados humanamente de acuerdo con las directrices publicadas (AVMA, 2013; NRC, 1985, 2010). El diseño del estudio y la capacitación del personal fueron suficientes para minimizar el dolor de los animales dentro de los confines de los objetivos del estudio. Todos los peces fueron eutanasiados utilizando una solución benzo-caina (1988-1990) o una solución de sulfonato de metano de tricaine (MS-222) de 500 mg L<sup>-1</sup> (2018) o 2 g L<sup>-1</sup> (estudio de bioacumulación) amortiguado con bicarbonato sódico a pH 7.0 según el procedimiento operativo estándar de laboratorio, preparado en agua de dilución de laboratorio.

Algunos estudios fueron realizados por un laboratorio externo, sus resultados se incluye aquí. La toxicidad aguda a las bacterias luminiscentes *Photobacterium phosphoreum* se determinó para C12br-7EO y L1315-7EO. Se determinó toxicidad aguda para el pez cebrá *Danio Rerio* (Directiva 84/449 CEE, CI, N° L 251/146 (19.9.84) y toxicidad crónica a *D. magna* (ISO TC 147/SC5/GT2 N° 28) para C12br-7EO; ambos conformes a la OCDE GLP.

## Métodos Analíticos

Intertek, Whit-house NJ realizó análisis elementales de contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxi-geno (C, H, N, O). El análisis se realizó utilizando un Analizador Elemental Perkin-Elmer 2400 CHN equipado con un kit de accesorios de oxígeno. Los valores medidos C, H, N, O se utilizaron para calcular el ThOD de la muestra para pruebas de biodegradación.

Las pruebas agudas de toxicidad acuática incluyeron el análisis de soluciones de prueba frescas y antiguas para el carbono orgánico total (TOC). Como mínimo, se analizaron los tratamientos de bajo, medio y alto nivel, mientras que durante muchas de las pruebas de toxicidad, se realizó un análisis toxicológico en muestras de cada nivel de tratamiento. Los análisis de TOC para estudios de C10br-9EO, C13br-3EO y C13br-5EO se obtuvieron utilizando el método de análisis infrarrojo de combustión de oxidación con un Analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu TOC-V. Para todos los demás estudios, el análisis de TCA se realizó en una O.I. Modelo 700 Analizador total de carbono. Todos los análisis de TCA se realizaron por duplicado.

Para los estudios C12br-7EO, C13br-7EO y C1315b-7EO, se cuantificaron los tensioactivos no iónicos totales como subposturas activas de tiocianato de cobalto (sustancias activas de tiocianato de cobalto). Se extrajeron muestras de agua de los tratamientos de prueba de bajo, medio y alto nivel que se complejizaron mediante el método Wickbold (Wickbold, 1972). Los extractos complejos fueron analizados por espectroscopia óptica siguiendo el procedimiento alineado en métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales, método 512C (Greenberg y otros., 1985).

Para el estudio de bioacumulación, se extrajeron y analizaron aliquots triplicados de pienso al inicio y al final del período de absorción (día 0 y 10). Se extrajeron muestras de alimento de un gramo con 25 ml de 50% de metanol/50% acetato de etilo. Las muestras se extrajeron durante 1 min por agitación manual seguida de 60 minutos de agitación mecánica. El contenido del vial se permitió establecerse durante 60 minutos, después de lo cual se colocaron coágulos en viales de auto-amplificador. Los peces fueron extraídos usando un Extractor de Disolventes Acelerado Dionex ASE 200 con una mezcla de 80% de metanol/20% acetato de etilo a 125 C y 1500 psi. Los extractos crudos de ASE se redujeron a un volumen final de 2,0 ml bajo una suave corriente de nitrógeno. Los extractos concentrados fueron luego centrifugados, y una porción de cada extracto concentrado se pasó a través de un Octadecilo Bakerbond condicionado (J.T. Baker) columna de limpieza de extracción desmontable de fase sólida y enjuagada con una mezcla de 50% de metanol/50% de agua antes de ser eluido con 90% metanol/10% agua. El volumen final recogido se ajustó a 0,5 ml. Las normas se prepararon fortaleciendo los peces de control con la sustancia de ensayo y llevándolos a través de los mismos procedimientos de extracción y limpieza que los peces de muestra.

Extractos de disolventes de dieta con picos y control y los cadáveres de pescado se realizaron en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) utilizando la cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS) (cromatografía líquida-espectrometría de masa).

operado en el modo de grabación selectiva de iones utilizando un LC Quattro micro-masa utilizando el software MassLynx (versión 3.5) con una bomba cuaternaria Hewlett-Packard 1050 y muestreador automático. Se analizaron los estándares fortificados de la sustancia de ensayo en la dieta de control y el pescado para la estandarización del método. El límite práctico de cuantificación (PQL) correspondiente era de aproximadamente 0,2 µg o 0,14 µg g<sup>-1</sup> para una muestra de pescado que pesaba 1,5 g. El lípido de pescado fue extraído por ASE y medido gravimétricamente. El método se basó en el descrito en la Nota de Aplicación Dionex 334 (1999).

## Análisis de Datos

### Análisis Toxicológicos Finales

Para las pruebas de toxicidad aguda, el método estadístico utilizado para calcular LC50s y los intervalos de confianza asociados del 95% se basó en el patrón de dosis-respuesta observado. Los métodos utilizados incluyeron el procedimiento PROC PROBIT en SAS (SAS, 2013), un procedimiento de probit basado en Litchfield y Wilcoxon (Litchfield y Wilcoxon, 1949), un modelo de regresión no lineal (Logistic 3P) (Ratkowsky, 1993), el método spearman-karber recortado (Hamilton et al., 1977), y el método binomial (Stephan, 1977). Las CE10 y EC50 de algas para la tasa de crecimiento se calcularon utilizando un cálculo de regresión de probit basada en los métodos de Finney (Finney, 1971).

Para las pruebas de toxicidad crónica, se determinaron los valores de Concentración de Efecto No Observado (NOEC) y Concentración de Efecto Observado más bajo (LOEC) para los datos de supervivencia y crecimiento del pececillo carpita cabezona y para los datos de supervivencia y reproducción de los padres de *C. dubia*. La prueba exacta de Fisher fue realizada en los datos de supervivencia de *C. dubia*. Para todos los datos restantes, se utilizó el procedimiento de Dunnett (datos paramétricos) o la prueba de rango de varios clasificados de Steel. (datos no paramétricos). La prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad y la prueba de Bartlett para la homogeneidad de la varianza se utilizaron para determinar el estado paramétrico de los datos. Estos procedimientos estadísticos formaban parte del software TOXSTAT (versión 3.0, 3.2) (Gulley et al., 1989; Gulley et al., 1990).

### Análisis de Punto Final de Bioacumulación

El BMF dietético, de lípidos correfidos (factor de biomagnificación); eficiencia de asimilación dietética; y se calcularon las vidas medias de todo el cuerpo corregidas por el crecimiento (OCDE, 2012). La fase de absorción de la prueba de bioacumulación dietética se describe mediante:

$$C_{\text{pescado}}(t) = \frac{EI}{K_T} [1 - e^{-K_T t}] C_{\text{dieta}} \quad (1)$$

donde el pescado  $C(t)$  es la concentración del producto químico en los peces en el momento  $t$  (µg g<sup>-1</sup>), la dieta  $C$  es la concentración de la sustancia química en la dieta [µg g<sup>-1</sup>],  $E$  es la eficiencia de asimilación de la sustancia química de la dieta,  $I$  es la tasa de ingestión [g alimento/g pescado húmedo/día],  $K_T$  es la tasa de eliminación de primer orden [día<sup>-1</sup>], y  $t$  es tiempo de exposición (días).

Durante la fase de depuración, la concentración en peces se describe mediante la ecuación lineal:

$$\ln C_{\text{pescado}}(t) = \ln C_{\text{pescado}}(0) - K_T t \quad (2)$$

donde los  $\ln C(0)$  y  $\ln C(t)$  denotan el logaritmo natural de la concentración en el tejido de los peces al principio y en el momento  $t$  del período de depuración, respectivamente.

Estos datos cinéticos se pueden utilizar para estimar la interceptación  $[\ln C_{\text{fish}}(0)]$  y la pendiente  $[K_T]$  en Eq. (2) utilizando regresión lineal. Como la interceptación también caracteriza la concentración del tejido de los peces al final del período de exposición, este valor junto con la estimación  $K_T$  derivada del experimento de depuración y el tiempo previsto para la absorción pueden sustituirse a Eq. (1) para estimar la eficiencia asimilativa de la dieta.

La tasa total de depuración obtenida utilizando Eq. (2) refleja la eliminación de branquias, la egestión fecal, la biotransformación y la dilución del crecimiento. La contribución en la dilución del crecimiento (utilizando tasas de crecimiento durante el período de estudio) permite el cálculo de una vida media corregida por el crecimiento para el cálculo del BMF, que luego puede expresarse sobre una base normalizada por lípidos (OCDE, 2012).

#### Análisis de TLM

El TLM para predecir la toxicidad acuática de las sustancias químicas estupefacientes polares y no polares se expresa de la siguiente manera:

$$\log(LC_{50,j}) = \log(CTLBB_i) - 0.94 \log(K_{ow,j}) + \Delta c_j \quad (3)$$

donde  $LC_{50,i,j}$  es la concentración del químico "j" en el organismo "i", correspondiente al 50% de mortalidad [mmol L<sup>-1</sup>];  $CTLBB_i$  es la carga corporal lipídica objetivo crítica del organismo "i" [mmol/kg-lípidos];  $K_{ow,j}$  es el coeficiente de partición octanol-agua de la sustancia química "j" [L-agua/kg-octanol]; y  $c_j$  son factores de corrección químicos específicos de la clase para "j" químico (Di Toro y McGrath, 2000; Di Toro et al., 2000; Kipka y Di Toro, 2009). Los valores de las cargas corporales críticas, la pendiente universal de la narcosis y los factores de corrección de la clase química se han actualizado constantemente desde el inicio del modelo a medida que se han desarrollado nuevos datos y se han añadido nuevas especies y productos químicos (Bragin et al., 2016; Di Toro y McGrath, 2000; Di Toro et al., 2000; Kipka y Di Toro, 2009; Redman et al., 2014b; Redman et al., 2017). Para este análisis, los valores de las cargas corporales críticas, la pendiente universal de la narcosis y los factores de corrección de la clase química se tomaron del reanálisis y actualización más reciente del TLM en 2018 (McGrath et al., 2018).

Históricamente, el TLM ha sido calibrado y aplicado utilizando coeficientes estimados de partición de octanol-agua (Di Toro et al., 2000). Esto se debe en parte a la ausencia o alta variabilidad en los valores experimentales para el gran número de productos químicos utilizados en la derivación y validación del modelo original. Las iteraciones tempranas del modelo utilizado SPARC realizan el razonamiento automatizado en química (SPARC

Realiza Razonamiento Automatizado en Química) estimaciones de registro ( $K_{ow}$ ), mientras que las actualizaciones posteriores de la TLM cambiaron a estimaciones basadas en EPI Suite (KOWWIN) del registro ( $K_{ow}$ ). Para los surfactantes, se han notificado grandes discrepancias entre el registro observado y el registro predictivo ( $K_{ow}$ ) para el registro predictivo por KOWWIN ( $K_{ow}$ ). Además, se demostró que varios métodos experimentales, probados por Hodges et al. en su trabajo anterior, tenían una variabilidad significativa. Más recientemente, se acerca el poliparámetro, como los de Abraham et al. (Abraham et al., 2004; Endo y Goss, 2014; Platts et al., 2000), se ha demostrado que demuestran excelentes capacidades predictivas para amplias gamas de clases químicas y mitades funcionales. En consecuencia, los coeficientes de partición de octanol-agua para la AEO se calcularon utilizando la relación de energía libre lineal del poliparámetro Abraham (pp-LFER) desarrollada por Goss (Goss, 2005), que se expresa como:

$$\log(K_{ow,j}) = e_{ow}E_j + s_{ow}S_j + a_{ow}A_j + b_{ow}B_j + v_{ow}V + c_{ow} \quad (4)$$

donde los descriptores mayores representan el exceso de refracción molar (E), polarabilidad (S), acidez de unión al hidrógeno (A), basicidad de unión al hidrógeno (B) y volumen McGowan (V) de un químico "j." Los descriptores minúsculos representan interacciones complementarias solventes del sistema, con interacciones  $c_{ow}$  inespecíficas que representan y que llevan las unidades del coeficiente de partición (Abraham y Acree, 2010; Abraham et al., 2004; Abraham y Zhao, 2004; Endo y Goss, 2014; Goss, 2006; Goss y Schwarzenbach, 2001; Platts et al., 2000). Los descriptores de soluto mayores son estimadas utilizando la base de datos LSER de la UFZ (Ulrich et al., 2017) a través de un enfoque basado en fragmentos. El trabajo anterior ha demostrado un excelente acuerdo entre descriptores experimentales y predichos por fragmentos para una amplia gama de químicas (Japertas et al., 2014; Platts et al., 1999).

Cabe señalar que pp-LFER para membrana y lípidos de almacenamiento (así como otras fases biológicas) se han desarrollado (Endo et al., 2011) y, en teoría, podrían ser sustituidos directamente en Eq. (3), eliminando la necesidad de una extrapolación del octanol a la membrana-agua,  $K_{mw}$ , coeficientes de partición. Esto minimizaría la incertidumbre general del modelo en la que se conocen los coeficientes de partición membrana-agua (Müller et al., 1999). Sin embargo, cuando también se deben estimar los  $K_{mw}$  (por ejemplo, utilizando un modelo pp-LFER), habrá una incertidumbre asociada. Actualmente no está claro si estas incertidumbres serían más pequeñas o mayores que las asociadas con los valores estimados de registro ( $K_{ow}$ ) para surfactantes.

Trabajos anteriores (McGrath et al., 2018) han demostrado correlaciones entre las cargas corporales críticas estimadas (CTLBB) y la pendiente universal de narcóticos (m). Por consiguiente, para actualizar el TLM mediante el registro KOWWIN ( $K_{ow}$ ), el CTLBB y la pendiente tuvieron que ser reestimados, ya que los parámetros del modelo están correlacionados. Además, en el cálculo de el valor HC5 (Eq. (6)),

la varianza y la media de las variables TLM se incluyen en la extrapolación. Aplicar directamente coeficientes de partición membrana-agua dentro del TLM (Eq. (3)), se requiere una recalibración completa del modelo. Este trabajo está en curso, pero está fuera de alcance para este análisis, que ofrece una aplicación de novo y un análisis del TLM a los surfactantes AEO, demostrando el modelo existente de aplicabilidad y precisión.

En consecuencia, el Goss pp-LFER fue seleccionado debido a la infrapredicción sistemática de octanol-agua partición coeficientes para AEO por el modelo KOWWIN (EPA, 2018) normalmente utilizado para estimar los valores KOW para el TLM. Además, se evaluaron y compararon varios otros modelos basados en fragmentos y el modelo lipídico-agua de membrana pp-LFER de Endo et al. (siempre que sea posible) con datos experimentales (ver Tablas S7–S9). Por último, los modelos KOWWIN y Goss pp-LFER se compararon con los valores KOW utilizados para derivar directrices de calidad del agua por Medio Ambiente de Canadá (2013) (su rendimiento se resume en la Fig. S1.).

Las predicciones de toxicidad crónica que utilizan TLM se derivan de la siguiente manera de las predicciones agudas de TLM (Eq. (3)):

$$CE_{i,j} = \frac{LC50_{i,j}}{ACR_i} \quad (5)$$

donde  $CE_{i,j}$  es el efecto crónico predicho por el TLM (comparable a un NOEC o EC10) para el organismo "i" y químico "j",  $LC50_{i,j}$  es el nivel agudo de efecto del 50% pronosticado en Eq. (3) para el producto químico "j", y  $ACR_i$  es la relación aguda a crónica para el organismo "i." Mientras que las relaciones agudas a crónicas individuales pueden variar considerablemente entre los estudios, se puede utilizar un valor promedio para cada organismo (para predecir efectos crónicos) o un valor medio global  $E[ACR_i]$  (para extrapolar niveles de efectos predichos por HC5) (McGrath et al., 2018). Cabe señalar que los niveles de efectos crónicos (CE) predichos no corresponden únicamente a un único punto final toxicológico crónico (es decir, NOEC, EC10), sino que están destinados a ser representativos de cualquiera de estos puntos finales (McGrath et al., 2018).

La ecuación para extrapolar hasta el umbral de concentración de peligro sobrepasa el umbral protector del 95% de las especies (HC5) del modelo agudo de TLM (Eq. (3)) es derivado por McGrath et al. (2004) y es el siguiente:

$$\log(HC5_j) = E[m] \log(K_{ow,j}) + E[\log(CTLBB_i)] + \Delta c_j - E[\log(ACR_i)] - k_z \sqrt{V[m] \log(K_{ow,j})^2 + V[\log(CTLBB_i)] + V[\log(ACR_i)]} \quad (6)$$

donde  $E[]$  y  $V[]$  representan la media y la varianza de las respectivas variables en todas las especies contenidas en el TLM

(definido anteriormente), respectivamente, y  $k_z$  representa el factor de extrapolación de confianza del 95% para una distribución log-normal (McGrath et al., 2018).

El desempeño de la TLM en la estimación de la toxicidad aguda y crónica, así como, en última instancia, derivando niveles de efectos HC5 basados en modelos, se comparó con datos experimentales mediante la evaluación del error cuadrado medio raíz (RMSE) de los niveles de efectos tóxicos loga-ritmicos en  $[mg L^{-1}]$ . El error RMS para el TLM agudo y crónico se calculó de la siguiente manera:

$$RMSE_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^n (EC_{i,j,k} - EC_{i,j,obs})^2}{N}} \quad (7)$$

donde  $RMSE_k$  es la raíz cuadrada del error del modelo respectivo "k",  $N$  es el número total de puntos de datos observados (para todas las especies, "i", y todos los productos químicos, "j"), y  $EC$  es una concentración de efectos dados (LC50, NOEC, EC10, etc.) para el chemi-cal y las especies dadas. A medida que los errores RMS se calculan en las variables transformadas en registro, un error RMS de 0,3 corresponde aproximadamente a un factor de  $2 \times$  el error predictivo medio en el espacio lineal, con un error RMS de 0,5 correspondiente a una aproximación a un factor de  $3 \times$  el error predictivo medio. Esta gama generalmente puede considerarse un límite práctico de los modelos QSAR para sistemas ambientales complejos (es decir, lipídico-agua, carbono orgánico-agua) para los que la heterogeneidad activa del sitio/estructural introduce una incertidumbre sustancial sobre los sistemas más homogéneos (es decir, el agua pura de disolvente) (Endo y Goss, 2014).

Todos los cálculos de modelos, análisis estadístico, procesamiento y visualización de datos se llevaron a cabo en el paquete de software R (R Development Core Team, 2018). Los parámetros predeterminados para el TLM se obtuvieron de McGrath et al. (2018) y se utilizaron tal cual a menos que se indique lo contrario.

## Resultados y Discusión

### Biodegradación de la AEO ramificada

El Comité Científico de Toxicidad, Ecotoxicidad y Medio Ambiente (CSTEE) de la Comisión Europea consideró que no era necesario utilizar los criterios de ventana de 10 días (es decir, el

nivel aceptado debe alcanzarse dentro de los 10 días posteriores a haber alcanzado el 10% de degradación en la prueba) para evaluar la biodegradabilidad de tensoactivos

en detergentes (CSTEE, 1999). La base de esta recomendación es la cinética asociada con diferentes homólogos presentes en muchos surfactantes comerciales, diferentes tasas cinéticas intermedias de metabolito, y la interferencia potencial de la degradación de moléculas madre por metabolitos. Si bien no es un requisito para llegar a una conclusión de biodegradabilidad definitiva, la ventana de 10 días se ha adoptado como un requisito más estricto para algunos programas de certificación voluntaria, y por lo tanto, esos resultados se informan aquí.

Los resultados definitivos de la biodegradación se presentan en la Tabla 2. La AEO derivada de oxo-alcoholes ramificados ricos en C8, C9, C10 y C11 con 1-20 etoxilatos pasan los criterios biodegradables de lectura en la ventana de 10 días, con una excepción. C11br-3EO cumplió con el umbral de 28 días para la biodegradabilidad fácilmente, pero no cumplió con los criterios de ventana de 10 días. Esto es sorprendente, ya que el oxo-alcohol rico en C11 pasa la ventana de 10 días, incluso cuando se prueba junto con la muestra C11br-3EO. La AEO derivada de los oxo-alcoholes ramificados ricos en C13 con ocho o más lunares de EO también cumplen con los criterios fácilmente biodegradables dentro de la ventana de 10 días. C13br-7EO superó el umbral de 28 días, pero no cumplió con los criterios de ventana de 10 días. Los estudios realizados a múltiples tasas de carga por sustancias indican un efecto dosis-respuesta donde concentraciones más bajas alcanzaron un mayor nivel de biodegradación durante los 28 días. Esto se reconoce como un problema potencial con la prueba de respirometría manométrica, donde los efectos inhibitorios de concentraciones relativamente altas de sustancia de ensayo pueden reducir el nivel de degradación alcanzado. En consecuencia, los resultados en estos sistemas de prueba que alcanzan el nivel de paso demuestran una biodegradabilidad lista sin restricciones (CSTEE, 1999).

Para evaluar esto, se predijo toxicidad aguda para los lodos activados utilizando el TLM (Redman et al., 2007) y comparadas a las concentraciones utilizadas en las pruebas de biodegradación. Los valores se proporcionan en el Cuadro S3 y demuestran que, cuando se prueban muy por debajo de su EC50 estimado, la biodegradación definitiva se logra fácilmente dentro de los criterios de ventana de 10 días (normalmente de 4 a 5 días), y la biodegradación general envejece más del 90%. Se observa más variabilidad cuando se prueba cerca (30%) EC50 estimados, donde la mayoría (70%) de las sustancias cumplieron con el requisito de ventana de 10 días y todas alcanzan el 60% de biodegradación dentro de los 2 días posteriores a la ventana de 10 días. Cuando las concentraciones de prueba estaban muy por encima (1,5-3×) no se logró el EC50 estimado, no se alcanzó la ventana de 10 días y el tiempo para superar el umbral del 60% fue más lento (13-25 días). Esta tendencia indica que los microbios pueden verse afectados y pueden recuperarse durante los 28 días de duración de la prueba, pero también que el TLM sería informativo al seleccionar concentraciones de pruebas de biodegradación.

Estudios anteriores han indicado que la biodegradación aeróbica del AEO ramificado depende de la estructura y el grado de ramificación de la cadena de alquilo. La EPA danesa resumió los datos sobre AEO C9-18 lineal que contiene 5-14 unidades de EO (Madsen et al., 2001), lo que indica que son finalmente

**Tabla 2** Resumen de los resultados de la prueba de biodegradación lista OCDE 301F

Sustancia	Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Día 28% biodeg.	Resultado (Ventana 10d)
C8br-4EO	43	91.7	Fácilmente (Y)
C8br-6EO	39	103 <sup>a</sup>	Fácilmente (Y)
	51	84.4	Fácilmente (Y)
C8br-8EO	42	100	Fácilmente (Y)
C8br-10EO	46	107 <sup>a</sup>	Fácilmente (Y)
C9br-1EO	41	81.7	Fácilmente (Y)
C9br-3EO	42	90.6	Fácilmente (Y)
C9br-5EO	41	82.9	Fácilmente (Y)
	37	96.6	Fácilmente (Y)
C9Sbr-7EO	40	102 <sup>a</sup>	Fácilmente (Y)
C9br-8EO	39	92.8	Fácilmente (Y)
	37	98.8	Fácilmente (Y)
C9br-20EO	37	95.4	Fácilmente (Y)
C10br-3EO	36	83.8	Fácilmente (Y)
	35	85.6	Fácilmente
	50	79.5	Fácilmente (Y)
C10br-7EO	39	87.5	Fácilmente (Y)
	54	84.2	Fácilmente (Y)
C10br-9EO	34	112 <sup>a</sup>	Fácilmente (Y)
C11br-3EO	34	77.2	Fácilmente
	33	81.0	Fácilmente
C11br-5EO	34	82.1	Fácilmente (Y)
	37	80.7	Fácilmente
C11br-7EO	36	106 <sup>a</sup>	Fácilmente (Y)
C11br-8EO	37	87.0	Fácilmente (Y)
C11br-10EO	36	95.2	Fácilmente (Y)
C13br-7EO	6.0, 12, 25, 48	85.7, 67.9, 66.6, 60.7 <sup>b</sup>	Fácilmente
	41	66.2	Fácilmente (Y)
	26	68.9	Fácilmente
C13br-8EO	58	67.8	Fácilmente
	22	66.9	Fácilmente
C13br-12EO	13, 25, 51	66.2, 68.2, 80.0 <sup>c</sup>	Fácilmente (Y)
	26	97.0	Fácilmente (Y, 1 conc)

<sup>a</sup> La sustancia alcanzó el 60% en 6-9 días y osciló entre el 76 y el 95% al final de la ventana de 10 días (véase el cuadro S3).

<sup>b</sup> Probado en múltiples concentraciones simultáneamente; inhibición potencial de microbios a concentraciones más altas.

<sup>c</sup> Probado en múltiples concentraciones simultáneamente; sin inhibición aparente de microbios.

degradado en condiciones aeróbicas, logrando entre 64% y 86% de degradación cuando se utilizan métodos de prueba más similares a este estudio (botella cerrada de 28 días o prueba de evolución de CO<sub>2</sub>). Niveles comparables de biodegradación (61-100%) en este estudio se observaron alcoholes ramificados ricos en C8-13 que contenían entre 1 y 20 unidades de EO. Es evidente, sin embargo, que la biodegradación más baja ocurre en el C13 más ramificado con niveles más bajos de EO que las cadenas de alquilo más cortas con menos ramificación (Fig. S2).

### Bioacumulación de AEO ramificada

Truchas arco iris juveniles fueron expuestas a C11br-3EO a través de su dieta. La concentración media de exposición medida en la dieta fue de 527  $\mu\text{g g}^{-1}$ . No hubo una pérdida significativa de sustancia de prueba en la dieta durante el período de absorción. El contenido de lípidos del pez al final de la fase de absorción fue del 2,24%. No se observó diferencia en la tasa de mortalidad o

crecimiento entre la dieta tratada y el control al final del estudio (24 días en total). Se determinó que la vida media de todo el cuerpo corregida por el crecimiento era de 0,36 días, con un valor BMF corregido por lípidos correspondiente de 0.012. Se han realizado estudios previos de bioacumulación acuosa, así como dietética, con oxoalcoholes ricos en C10 (C10br-0EO) y ricos en C13 (C13br-0EO) en truchas arco iris juveniles.

**Tabla 3** Resultados de pruebas de toxicidad acuática aguda

Sustancia	Especies	Extremo	Concentración de efectos mg/L <sup>a</sup>
C10br-9EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	128 (117–141)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	>100 <sup>b</sup>
	<i>Q. promelas</i>	96h LC50	39 (29–52)
C12br-7EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	36.9 (27.2–58.5)
	<i>P. phosphoreum</i>	15m EC50	6.4
	<i>D. magna</i>	48h EC50	6.84 (5.52–8.46)
	<i>O. mykiss</i>	96h LC50	6.7 (6.0–7.5)
	<i>P. promelas</i>	96h LC50	6.3
C12br-12EO	<i>D. rerio</i>	96h LC50	13.5 (12.1–15.2)
	<i>Q. subcapitata</i>	96h EC50	210 (154–324)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	30.2 (23.2–39.4)
	<i>O. mykiss</i>	96h LC50	31.5 (26.3–37.7)
C13br-3EO	<i>P. promelas</i>	96h LC50	26.0 (23.3–29.0)
	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	6.0 (5.6–6.5)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	1.1 (0.98–1.3)
	<i>Q. promelas</i>	96h LC50	>1.8 <sup>c</sup>
C13br-5EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	8.4 (7.9–8.8)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	4.5 (3.8–5.3)
	<i>Q. promelas</i>	96h LC50	1.8 (1.6–2.1)
C13br-7EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	25.6 (19.7–46.9)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	5.92 (5.02–6.99)
	<i>O. mykiss</i>	96h LC50	4.62 (3.40–6.28)
	<i>P. promelas</i>	96h LC50	4.41 (3.69–5.27)
C13br-12EO	<i>P. subcapitata</i>	96h EC50	172 (cnc)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	37.0 (30.0–48.3)
	<i>O. mykiss</i>	96h LC50	13.9 (12.2–15.9)
	<i>P. promelas</i>	96h LC50	15.7 (13.2–18.8)
C1315a-7EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	0.61 (0.50–0.74)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	0.74 (0.42–1.31)
	<i>P. promelas</i>	96h LC50	1.48 (1.25–1.75)
C1315b-7EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	0.74 (cnc)
	<i>P. phosphoreum</i>	15m EC50	1.71
	<i>D. magna</i>	48h EC50	0.61 (0.46–0.80)
	<i>O. mykiss</i>	96h LC50	1.2 (1.0–1.5)
	<i>P. promelas</i>	96h LC50	1.28 (1.12–1.47)
C1315a-12EO	<i>P. subcapitata</i>	72h EC50	5.7 (cnc)
	<i>D. magna</i>	48h EC50	3.20 (2.73–3.74)
	<i>O. mykiss</i>	96h LC50	3.78 (3.16–4.52)
	<i>P. promelas</i>	96h LC50	2.73 (2.44–3.04)

<sup>a</sup> Intervalo de confianza del 95% entre paréntesis.

<sup>b</sup> Inmovilización del 35% a dosis altas.

<sup>c</sup> Mortalidad del 36% a dosis altas.

(Camenzuli et al., 2019). En las pruebas acuosas, las concentraciones de tejido de peces en estado estacionario se lograron dentro de un período de exposición de 16 días (C10br-0EO) o 10 días (C13br-0EO). Los valores de BCF de estado estacionario normalizados por lípidos del 5% fueron de 21 L kg<sup>-1</sup> (C10) y 39 L kg<sup>-1</sup> (C13) de peso de pescado húmedo, y los valores de BMF calculados en la dieta corregidos por lípidos fueron  $\leq 0,016$  (a niveles de tratamiento de 500 y 2500 ppm) para ambos alcoholes, con medias vidas de todo el cuerpo corregidas por el crecimiento de menos de 0,6 días. Estos datos son consistentes con numerosos estudios que demuestran que los alcoholes y sus etoxilatos son altamente metabolizables (Belanger et al., 2009; Tolls et al., 2000).

### Toxicidad aguda de la AEO

Los resultados analíticos demostraron que las concentraciones medidas se correlacionaban bien con las concentraciones nominales (generalmente del 20%) y que la sustancia de ensayo era estable y estaba presente en soluciones (poca o ninguna pérdida) durante la duración del estudio. Para el C13br-3EO y C13br-5EO, TOC no era sensible a concentraciones por debajo de ca. 10 mg L<sup>-1</sup>, por lo que sólo se analizaron las soluciones de tratamiento más altas y de stock. Restricciones similares se produjeron con el análisis TOC de las pruebas iniciales de C1315a-7EO, donde las concentraciones nominales estaban por debajo de 5 mg L<sup>-1</sup>, aunque las pruebas posteriores de C1315b-7EO a concentraciones ligeramente más altas incluyeron confirmación analítica que confirmaba la presencia y estabilidad de la concentración. Todas las sustancias son fácilmente solubles en las concentraciones probadas; por lo tanto, todos los resultados se basan en concentraciones nominales.

Las concentraciones letales medias (LC50s) fueron superiores a 10 mg L<sup>-1</sup> para C10br-9EO, C12br-12EO y C13br-12EO. Se observó toxicidad aguda que va de 1–10 mg L<sup>-1</sup> para C12br-7EO, C13br-3EO, C13br-5EO, C13br-7EO y C1315-12EO. Sólo el C1315-7EO semilineal sería considerado “muy tóxico para los

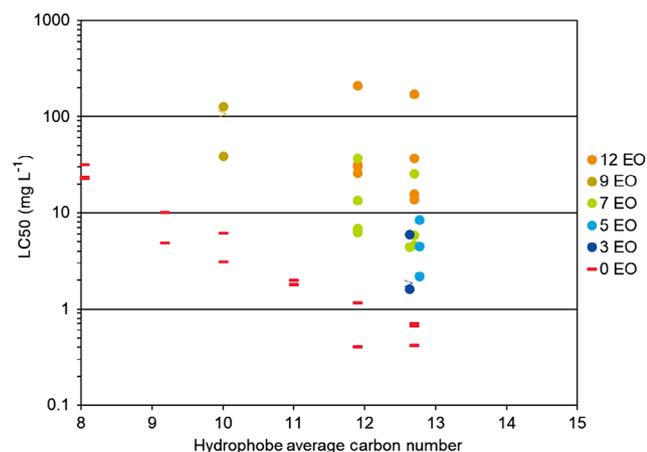


Fig. 1 Efecto de la longitud de la cadena de hidrófobo (oxo-alcohol) y etoxilato (EO) sobre toxicidad acuática aguda. La toxicidad aumenta con el aumento de la longitud de la cadena hidrofóbica y disminuye con el aumento de EO. Los símbolos mayores que indican menos del 50% de efecto a la concentración más alta probada. Las líneas negras sólidas horizontales corresponden a umbrales de clasificación GHS. Toxicidad de los alcoholes ramificados asociados añadidos cuando estén disponibles (cuadrados rojos).

los organismos acuáticos” (LC50 0.1–1.0 mg L<sup>-1</sup>). Los resultados individuales del estudio se presentan en el Cuadro 3. Cabe señalar que, para estudios de algas de 96 h, cuando la inhibición porcentual de la tasa de crecimiento a 72 h fue mayor, se presentan esos resultados. Estos hallazgos son consistentes con las evaluaciones de toxicidad acuática de AEO (Madsen et al., 2001), que han demostrado un aumento de la toxicidad con el aumento de la longitud de la cadena de hidrófobos y con la disminución de la longitud de la cadena EO (Fig. 1).

### Toxicidad crónica de AEO

Se desarrollaron datos de toxicidad acuática crónica para tres niveles tróficos para 7 mol de etoxilatos de un oxoalcohol ramificado rico en C12 y rico en C13 y para una mezcla de homólogos semilineales de C13 / C15. Se obtuvieron datos crónicos de algas para una gama más amplia de OEA (Cuadro 4). Cabe señalar que el estudio C. dubia con C12br-7EO finalizó el día 7, mientras que el 70% de los controles tenía sólo dos crías según la guía de prueba anterior. La guía de examen actual requiere tres crías en al menos el 60% de los organismos de control (dentro de 8 días). Hubo una respuesta clara de concentración, y el resultado es consistente con el estudio D. magna con C12br-7EO (NOEC 2.5 y 5.5 mg L<sup>-1</sup>).

Una tendencia similar de aumento de la toxicidad con el aumento de la longitud de la cadena de hidrófobo y con la disminución de la longitud de la cadena EO es evidente (Fig. S3), aunque los datos para evaluar el efecto de la longitud de EO están disponibles solo para algas. Pez parecían ser las

Tabla 4 Resumen de los resultados de las pruebas de toxicidad acuática crónica

Sustancia	Especies	Extremo	Efecto concentración (mg/L)
C10br-9EO	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	54 (39–66)
C12br-7EO	<i>C. dubia</i>	7d NOEC/LOEC <sup>a</sup>	2.5/5.0
	<i>D. magna</i>	19d NOEC/LOEC <sup>a</sup>	5.5/8.0
	<i>P. promelas</i>	7d NOEC/LOEC <sup>b</sup>	0.625/1.25
C12br-12EO	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	15 (0–25)
	<i>P. subcapitata</i>	96h ErC10	25 (0–89)
C13br-3EO	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	1.9 (1.5–2.4)
C13br-5EO	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	2.6 (2.3–2.8)
C13br-7EO	<i>C. dubia</i>	7d NOEC/LOEC <sup>a</sup>	1.25/2.5
	<i>P. promelas</i>	7d NOEC/LOEC <sup>b</sup>	0.75/1.5
	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	9.6 (0–15)
C13br-12EO	<i>P. subcapitata</i>	96h ErC10	cnc
C1315a-7EO	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	0.19 (0–0.32)
	<i>C. dubia</i>	7d NOEC/LOEC <sup>a</sup>	0.5/1.0
C1315b-7EO	<i>P. promelas</i>	7d NOEC/LOEC <sup>b</sup>	0.625/1.28
	<i>P. subcapitata</i>	72h EC10	0.38 (cnc)
C1315a-12EO	<i>P. subcapitata</i>	72h ErC10	3.5 (cnc)

<sup>a</sup> Reproducción, efecto crónico.

<sup>b</sup> Crecimiento, efecto crónico a corto plazo.

parecían ser las especies más sensibles para los AEO C12br-7EO y C13br-7EO ramificados, mientras que los tres niveles tróficos de peces, invertebrados y algas eran comparablemente sensibles al semilineal L1315-7EO.

### Rendimiento de TLM para toxicidad aguda de AEO

Para AEO ramificada y semilineal en este estudio (Tablas 3 y S1.), así como los datos bibliográficos compilados (Tabla S2), el TLM se aplicó a priori en una predicación ciega de los niveles de efectos de toxicidad aguda para dos especies de algas (*P. subcapitata* y *Scenedesmus subspicatus*), un invertebrado (*D. magna*), y varias especies de peces (*P. promelas*, *O. mykiss* y *D. rerio*), así como el bioensayo de microtox (*P. fósforo*). Las cargas corporales críticas para *P. subcapitata* fueron tomadas de Bragin et al. (2016), en el que habían reestimado los valores de carga corporal del modelo original de TLM. Las cargas corporales críticas para todas las demás especies fueron tomadas del modelo TLM reevaluado de 2018 (McGrath et al., 2018), junto con la pendiente universal de narcóticos y los factores de corrección de la clase química. Para los homólogos singulares de la AEO, las estructuras exactas se utilizaron para generar los descriptores moleculares (Eq. (4)) para estimar los valores de registro (KOW) para su uso en los cálculos de TLM (Eq. (3)). Tanto para las sustancias lineales como ramificadas, inicialmente, se construyó una estructura representativa utilizando los números promedio de carbono y EO, así como información sobre el grado y la ubicación de la ramificación. Los resultados de la predicación TLM para toxicidad aguda de AEO se muestran en Fig. S4.

El TLM para estas estructuras representativas proporciona generalmente un buen acuerdo (RMSE 0.051–0.879) en las siete especies de prueba, con el modelo a menudo funcionando mejor para las sustancias AEO ramificadas en el estudio actual (Fig. S4). Para *P. subcapitata*, a pesar del aumento de la carga corporal crítica, el modelo TLM sobreprece sistemáticamente la toxicidad para cuatro de los siete AEO ramificados (Fig. S4d). Además, las mezclas lineales de AEO están sistemáticamente infra-predecidas para *P. promelas* y *D. magna* (Fig. S4a, b) comparadas a las sustancias ramificadas en este estudio.

Trabajos anteriores (Boeije et al., 2006) han puesto de relieve la dificultad de utilizar estructuras representativas para predecir la ecotoxicidad de las mezclas de OEA con amplias gamas de números de cadena de carbón y etoxilato. Como la respuesta toxicológica (es decir, LC50) no varía linealmente con el número de carbono, el uso de una estructura promedio para una amplia distribución de carbono (es decir, una mezcla binaria) o el número de etoxilato puede resultar en errores sustanciales en la toxicidad prevista del compuesto promedio en comparación con la mezcla observada. Para mezclas de C8EO4 y C16EO8 (estructura promedio C12EO6), las CE50 para *D. magna* se sobreestimaron en aproximadamente un factor de 5 ×, donde una mezcla de C10EO8 y C14EO8 (estructura promedio: C12EO8) fue sobreestimado por un factor de 2,6×. Este efecto es particularmente pronunciado

para mezclas binarias con una amplia gama de longitud de cadena de alcohol, nivel de EO, o ambos. Esto puede explicar el rendimiento mejorado del modelo de las sustancias AEO ramificadas de distribución más estrecha (este estudio), utilizando una única estructura representativa, sobre la del AEO lineal de mezcla binaria (Wong et al., 1997) para *D. magna* y *P. promelas*.

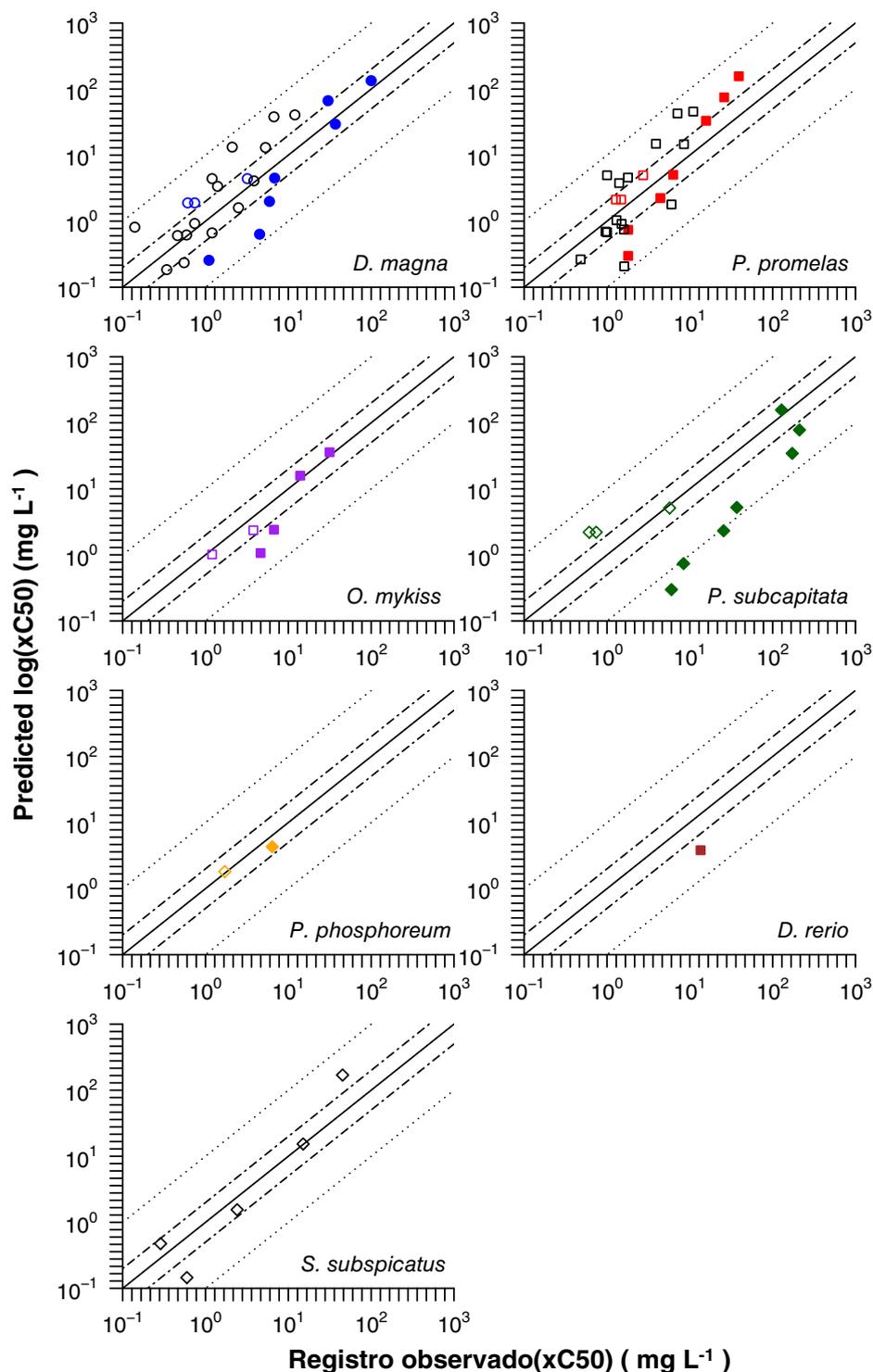
En consecuencia, la toxicidad aguda de las sustancias OEA se reevaluó utilizando un enfoque de adición de unidad tóxica (TU), esbozado por Loewe (1953) y aplicado previamente por Di Toro y McGrath (2000) para describir los efectos tóxicos de las mezclas de hidrocarburos de petróleo. Para este método, las sustancias se subdividen en constituyentes representativos y las toxicidades de los constituyentes individuales se calculan utilizando el modelo TLM, con la concentración del efecto para la sustancia calculada de la siguiente manera:

$$EC_{\text{mix}} = \frac{1}{\sum TU_j} = \frac{1}{\sum f_j/EC_j} \quad (8)$$

cuando  $EC_j$  es la concentración de efecto predicho por TLM (es decir, LC50) del constituyente "j",  $f_j$  es la fracción de peso de "j" del constituyente dentro de la mezcla AEO,  $TU_j$  es la contribución unitaria tóxica calculada del constituyente "j", y la mezcla CE es la concentración de efecto resultante de la mezcla por adición de TU. La mezcla de CE calculada a partir del TLM y la información compositiva relevante para las mezclas AEO se compararon luego con los datos experimentales y las predicciones del enfoque de estructura representativa, descrito anteriormente. Los resultados finales agudos de TLM utilizando la adición de TU se muestran en la Fig. 2. Errores RMSE (Eq. (7)) para las especies individuales son tabulados (Cuadro S2) y son resumidos por grupo taxonómico en el Cuadro 5.

Las predicciones de TLM para *D. magna* y *P. promelas* mejoran significativamente cuando se consideran las contribuciones de los constituyentes individuales, en contraposición a una estructura representativa única (y log (KOW)). La mejora de los efectos agudos previstos es más pronunciada tanto para las mezclas binarias de OEA (Wong et al., 1997) como para los mezcladores semilineales de OEA incluidos en este estudio (véase el Cuadro S2). Este resultado no es inesperado ya que las distribuciones de longitud de la cadena de alquilo subyacente, esencialmente bimodal (frente a una distribución cuasi-gaussiana ajustada alrededor de la longitud media de la cadena de carbono para el AEO ramificado (Tabla 1)), deberían producir resultados considerablemente diferentes cuando el promedio se utilizan estructuras representativas.

Se observó poca mejoría para la toxicidad aguda de la OEA ramificada para *P. subcapitata*, que mostró el rendimiento general más débil del TLM (incluyendo la sobrepredicción sistemática de toxicidad para seis de las siete AEO ramificadas). Sin embargo, cabe señalar que el TLM funciona bien para el semilineal (este estudio) y los homólogos estructurales únicos 52, con errores RMS comparables a los observados para las especies de peces e invertebrados (Tabla S2). En general, el enfoque de adición de TU da como resultado aproximadamente una mejora de la unidad de registro 0,1 en la precisión predictiva del TLM para la toxicidad



**Fig. 2** Adición de unidades tóxicas (TU) Predicho por TLM frente a las toxicidades agudas observadas para siete organismos acuáticos. Los símbolos de color indican datos experimentales para OEA ramificada (rellenada) o OEA semilínea (abierta) de este estudio. Los símbolos negros abiertos indican datos de literatura. Las líneas sólidas representan 1:1 acuerdo, las líneas semidashed representan un factor de  $2\times$  error predictivo, y las líneas punteadas representan un factor de  $10\times$  error predictivo. Errores RMSE (Eq. (7)) para las especies individuales están tabuladas y se resumen en el Cuadro S2.

precisión predictiva del TLM para la toxicidad aguda de las especies AEO probadas. El error RMS general obtenido para las mezclas AEO (RMSE = 0,491) es comparable a errores

típicos del modelo para los conjuntos de datos de TLM mucho más grandes (RMSE = 0,460–0,566) informados anteriormente (Kipka y Di Toro, 2009).

**Tabla 5** RMS errors for TLM-predicted acute and chronic toxicity using representative AEO structures (AVG) and toxic unit addition (TU) methods

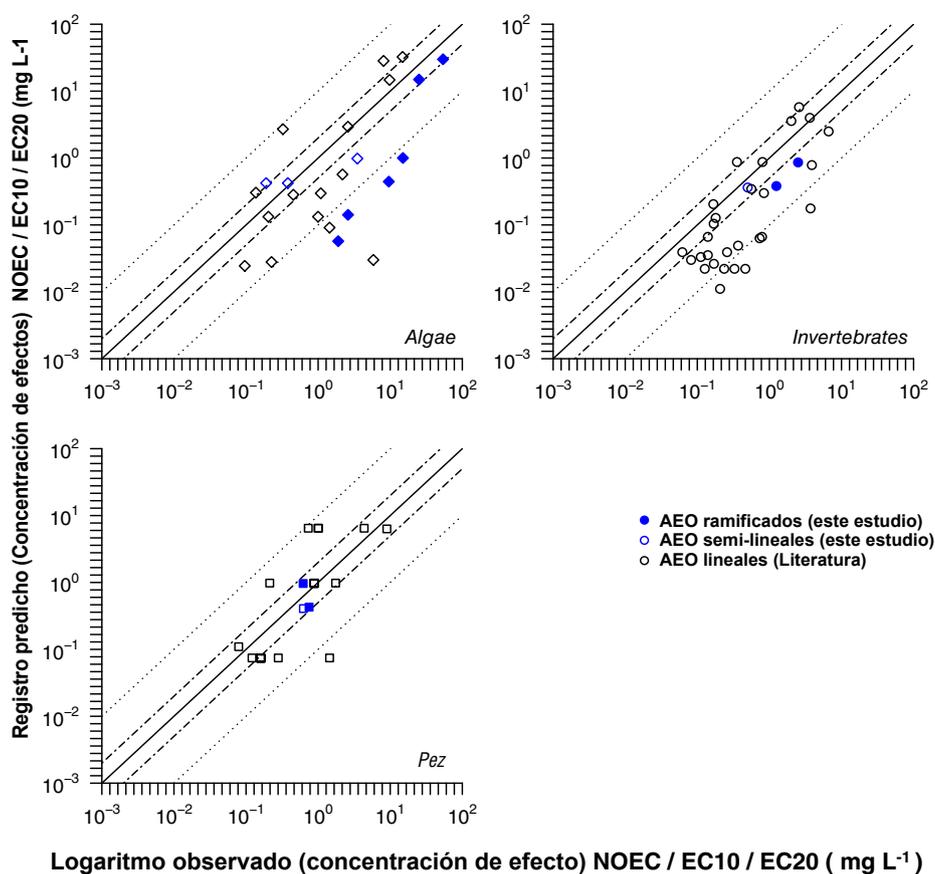
Grupo	Agudo			Crónico	
	N	TLM (AVG)	TLM (TU)	N	TLM (TU)
Algas	15	0.663	0.665	27	1.037
Invertebrate	25	0.559	0.447	31	0.702
Pez	32	0.593	0.440	21	0.507
Total	74	0.589	0.491	79	0.793

### Rendimiento de TLM para toxicidad crónica de la AEO

Se evaluó la toxicidad crónica para las nueve AEO en este estudio y los datos adicionales de la literatura recopilada (Belanger et al., 2006), nuevamente utilizando el modelo TLM, a priori. Varias especies de ensayo para las que se dispusieron de datos crónicos no han establecido cargas corporales críticas (CBB) dentro del marco modelo TLM. Para estas especies, el valor medio para la reevaluación de CBB TLM (McGrath et al., 2018) fue Se utilizó el valor (ACR = 5.22).

Esto es consistente con el enfoque utilizado para calcular el HC5 a partir de datos agudos (Eq. (4)). Debido al gran número de especies, los organismos se agruparon en tres clases taxonómicas generales: algas, invertebrados y peces para la visualización. Los resultados de la predicción TLM para toxicidad crónica de AEO se muestran en la Fig. 3, con errores RMSE asociados (Eq. (7)) para las especies individuales tabuladas (Tabla S2) y resumidas por grupo taxonómico en la Tabla 5.

Los errores de predicción de TLM para la toxicidad crónica son ligeramente mayores que los de toxicidad aguda de la AEO. Esto se debe potencialmente a las dudas discutidas anteriormente en la carga corporal de las especies de prueba, así como al uso de un valor ACR promedio. Además, cabe señalar que, en el caso de los efectos crónicos, se consideran múltiples puntos finales (es decir, NOEC, EC10) y se incluyen, tanto en este análisis como en el desarrollo y evaluación del modelo TLM (McGrath et al., 2018). Para curvas de dosis-respuesta más amplias o datos experimentales más variables, esto puede dar lugar a errores adicionales cuando se incluyen varios tipos de punto final en el mismo análisis.



**Fig. 3** Comparación de toxicidades crónicas predichas por TLM frente a las observadas utilizando estructuras AEO representativas. Los símbolos de color indican datos experimentales para AEO ramificada (rellenada) o AEO semilineal (abierta) de este estudio. Los símbolos negros abiertos indican datos de literatura. Las líneas continuas representan una concordancia 1: 1, las líneas semi discontinuas representan un factor de  $2 \times$  error predictivo y las líneas punteadas representan un factor de  $10 \times$  error predictivo. Errores RMSE (Eq. (7)) para las especies individuales están tabuladas y se resumen en el Cuadro S2

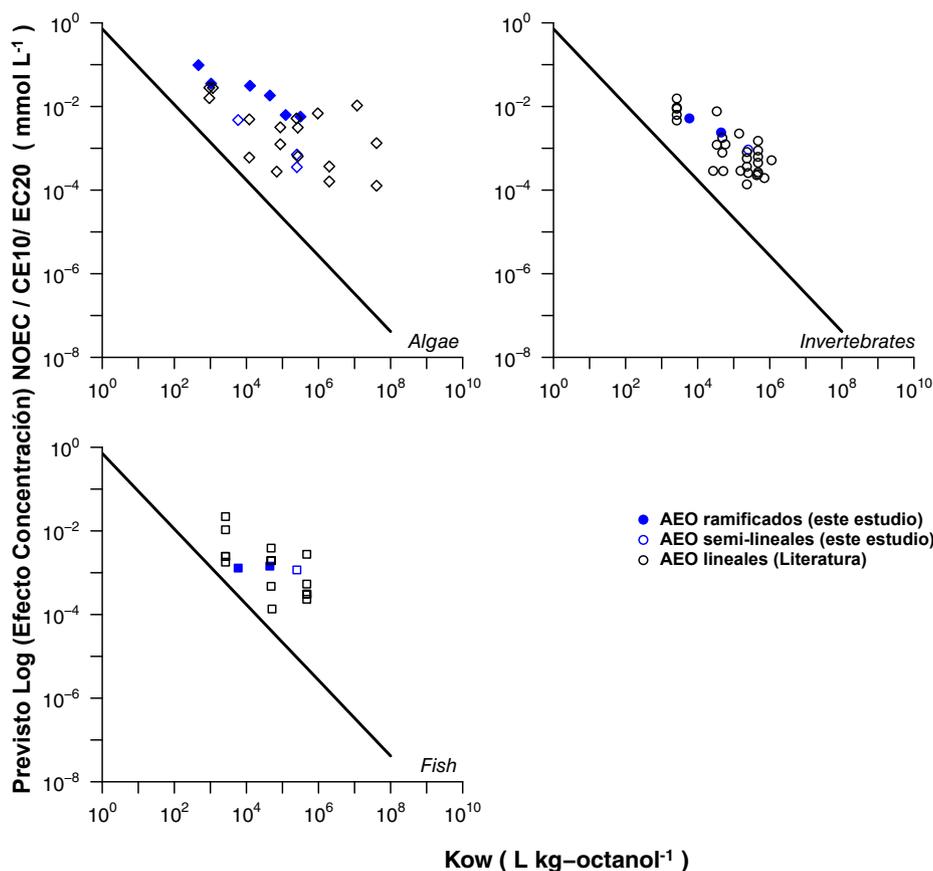


Fig. 4 Comparación del HC5 predicho por TLM frente a las toxicidades crónicas observadas en función del octanol — coeficiente de partición de agua ( $K_{ow}$ ). Los símbolos de color indican datos experimentales para AEO ramificada (relleno) o AEO semilineal (abierto) de este estudio. Los símbolos negros abiertos indican datos de literatura. Las líneas sólidas representan el HC5 (Eq. (6)) en función de  $K_{ow}$ , protectora del 95% de las especies.

A pesar de estas incertidumbres, para los peces, la precisión de la predicción es generalmente comparable a las predicciones agudas (RMSE crónica de 0,507 versus RMSE aguda de 0,491), mientras que los errores crónicos de RMS para los invertebrados y las algas fueron 0,26 y 0,37 unidades logarítmicas más altas (aproximadamente 1,8× y 2,5× más alto) que los errores agudos de RMS, respectivamente.

#### Comparación de Datos de Toxicidad Crónica con HC5 predichos por TLM

Para confirmar que un valor HC5 derivado de TLM (Eq. (6)) es suficientemente protector, los datos crónicos de toxicidad de la AEO se compararon con el valor básico del narcótico HC5, y los resultados se trazaron en función del coeficiente de partición octanol-agua. Los resultados de esto se ilustran en la Fig. 4.

Hubo 79 puntos de datos de efectos crónicos que representan el criterio de valoración crónico más sensible observado para los tres taxones generales (algas, invertebrados, peces) que incluyen 15 especies únicas y varias etapas de vida (ver Tabla S2). Para las 79 observaciones,

cuatro o menos criterios de valoración crónicos por debajo de la línea de base HC5 constituiría un valor de nivel umbral que protege  $\geq 95\%$ . Como no se observaron efectos crónicos por debajo del HC5 de referencia, se puede considerar que los valores umbral derivados del TLM para AEO demuestran una protección adecuada de las especies sensibles.

#### Clasificación Aguda y Crónica de la AEO mediante TLM

En la Tabla 6 se presenta una comparación de la asignación de clasificación GHS de los datos experimentales a los valores predichos de TLM. La asignación de la clasificación de toxicidad acuática aguda a partir de las predicciones de TLM está de acuerdo con los valores de experimentales, con asignaciones "correctas" en el 63% de los casos. Para los casos restantes, la clasificación se predice en exceso en el 21% de los casos, pero se predice de manera insuficiente en solo el 16% de los casos. Aunque las asignaciones correctas son ligeramente más bajas para AEO ramificado (56%), el TLM es conservador, con solo el 4% de los casos ( $n = 1$ ) subestimados. Para 9 de los 15 casos (60%) de sobrepredicción por TLM para una especie determinada, los valores predichos eran consistentes con la toxicidad medida y pronosticada niveles para otras especies

**Tabla 6** Matriz de predicción para la clasificación de ecotoxicidad aguda y crónica de GHS

Experimental	TU TLM predicted: all data [branched AEO]				
	Agudo	Agudo 1 $\times C50 \leq 1$	Agudo 2 $1 < \times C50 \leq 10$	Agudo 3 $10 < \times C50 \leq 100$	No agudo $\times C50 > 100$
Agudo 1; $\times C50 \leq 1$		11 [0]	3 [0]	0 [0]	0 [0]
Agudo 2; $1 < \times C50 \leq 10$		10 [6]	23 [7]	6 [0]	0 [0]
Agudo 3; $10 < \times C50 \leq 100$		0 [0]	3 [3]	9 [6]	2 [1]
No agudo; $\times C50 > 100$		0 [0]	0 [0]	2 [2]	2 [2]

Chronic <sup>a</sup>	TU TLM predicted: all data [branched AEO]			
	Crónico 1 $CE \leq 0.01$	Crónico 2 $0.01 < CE \leq 0.1$	Crónico 3 $0.1 < CE \leq 1$	No crónico $CE > 1.0$
Crónico 1; $CE \leq 0.01$	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]
Crónico 2; $0.01 < CE \leq 0.1$	1 [0]	4 [0]	1 [0]	0 [0]
Crónico 3; $0.1 < CE \leq 1$	1 [0]	20 [0]	20 [2]	3 [0]
No crónico; $CE > 1.0$	0 [0]	4 [1]	10 [4]	14 [3]

	Agudo		Crónico	
	Todo	Ramificado	Todo	Ramificado
Correcto:	45 (63.4%)	15 (55.6%)	38 (48.7%)	5 (50%)
Sobrepredicado	15 (21.1%)	11 (40.7%)	36 (46.0%)	5 (50%)
Infrapredicado	11 (15.5%)	1 (3.7%)	4 (5.1%)	0 (0%)

<sup>a</sup> Los rangos de clasificación/toxicidad crónica de GHS para sustancias rápidamente biodegradables.

(es decir, no da lugar a una sobreclasificación de la sustancia). Muchas (64%) de las predicciones insuficientes del TLM ocurren cuando los valores predichos o medidos están cerca de un umbral de clasificación.

Informes anteriores han mostrado un riesgo toxicológico acuático inherente más bajo atribuible a AEO altamente ramificado en comparación con análogos lineales o semilineales. Estos hallazgos también se reflejan en las Recomendaciones para la Clasificación y Etiquetado Armonizados desarrollados por el Comité Europeo de Tensioactivos Orgánicos y sus Intermedios (CESIO), que recomienda una clasificación GHS relativamente menos severa para un número alternativo de servicios químicos abstractos comúnmente utilizado para describir el trimero de buteno. C13 AEO ramificado basado (CESIO, 2017). Los resultados presentados aquí apoyan de manera similar la disminución de la clasificación de riesgos ambientales para los etoxilatos ramificados probados.

Ninguno de los AEO ramificados probados está comprendido en los criterios de clasificación como “muy tóxico para la vida acuática” ( $LC50 \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Tanto los etoxilatos de 3-mol como los 5-mol del alcohol oxo rico en C13 fueron evaluados específicamente para abordar si la toxicidad aguda puede ser sobreestimada si se basa en la lectura a AEO lineal o semi-lineal de longitud de cadena de carbono similar. Los datos para tres niveles tróficos confirman que la toxicidad aguda para C13br-3EO y C13br-5EO se encuentra dentro del rango de toxicidad aguda de 1-10  $\text{mg L}^{-1}$  y que la lectura a través no es apropiada, y las predicciones de TLM son demasiado conservadoras.

Basado en una evaluación de los datos de la literatura subyacente utilizados en la evaluación TLM (ver Tabla S2), lineal y alcoholes semilineales de longitud de cadena de carbono de C12-13, C12-15, C13/15 y C14-15 AEO con un rango de 3, 4,5/6, 5, 6,5 y 7 mol de EO se clasificarían como GHS Categoría acuática aguda 1, con valores  $LC50 \leq 1 \text{ mgL}^{-1}$  para las especies más sensibles. En cambio, sin embargo, la AEO ramificada de longitud y nivel similares de la cadena de carbono de EO (C12br-7EO, C13br-3EO, C13br-5EO, C13br-7EO) son menos tóxicas para los organismos acuáticos (con valores  $LC50$  entre 1 y 10  $\text{mg L}^{-1}$ ) y se clasificarían como GHS Agudo 2. Del mismo modo, los datos C12br-12EO y C13br-12EO admiten la clasificación como GHS Agudo 3 ( $LC50$ : 10–100  $\text{mg L}^{-1}$ ) versus un C12-15-12EO de base hidrófoba semilineal, que se clasificaría de manera más estricta como Agudo 2. En una cadena de alcohol de menor longitud, el C10br-9EO cumple con los criterios GHS Agudo 3.

## Conclusiones

Una amplia gama de tensioactivos AEO derivados de oxo-alcoholes ramificados ricos en C8, ricos en C9, ricos en C10, ricos en C11 y C13 ricos en oxo-alcoholes con 1-20 mol de etoxilato fueron probados y se encontró que cumplen con los criterios fácilmente biodegradables de la OCDE y por lo tanto se espera que experimenten una rápida degradación en el medio ambiente. Además, los resultados preliminares indican que, al igual que sus compuestos originales, los AEO derivados de oxoalcoholes ramificados exhiben un bajo potencial de bioacumulación en organismos acuáticos.

La toxicidad acuática de la AEO ramificada se ha sobreestimado cuando se aplicó la lectura a través de una cadena similar longitud lineal o semilineal AEO. De acuerdo con los informes publicados anteriormente, este estudio observó una toxicidad inherente más baja para los AEO altamente ramificados en comparación con los análogos semilineales, lo que puede dar como resultado una clasificación GHS y un requisito de etiquetado más bajos de lo que se predijo previamente a partir de la extrapolación del AEO lineal.

Se ha demostrado que el TLM predice la toxicidad aguda de las mezclas AEO ramificadas y lineales y los homólogos individuales, con precisiones comparables a las observadas para otros narcóticos orgánicos neutros. Se demostró que la adición de TU de AEO constituyente individual mejoró el rendimiento del TLM para la toxicidad aguda, así como las predicciones crónicas de toxicidad para las mezclas de AEO. Además, se ha demostrado que los niveles de umbral HC5 derivados de TLM son suficientemente protectores si se comparan con los datos de toxicidad crónica disponibles para la AEO. Esto apoya el uso del modelo TLM en la evaluación de riesgos para nuevas mezclas y AEO.

Si bien el estudio actual y el análisis de TLM se han centrado en la evaluación del riesgo acuático, el marco de TLM proporciona la plataforma para ampliar los umbrales de efectos predictivos a los organismos sedimentos y del suelo utilizando los principios de la teoría de la clasificación de equilibrio y basándose en trabajos previos para hidrocarburos petrolíferos (Redman et al., 2014b) y para los homólogos únicos de AEO (Droge et al., 2008), que representan propiedades de sorción de AEO a minerales orgánicos de carbono y arcilla en sedimentos (Droge et al., 2009). La validación y aplicación del marco de TLM en esta capacidad podría permitir una evaluación más sólida del peligro y el riesgo ecológicos, en particular cuando los datos experimentales son limitados o cuando debe evaluarse un gran número de sustancias candidatas.

**Conflicto de intereses** Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

## Referencias

- Abraham, M. H., & Acree, W. E. (2010) Ecuaciones para la transferencia de moléculas neutras y especies iónicas del agua a las fases orgánicas. *Journal of Organic Chemistry*, 75:1006–1015. <https://doi.org/10.1021/jo902388n>
- Abraham, M. H., Ibrahim, A., & Zissimos, A. M. (2004) Determinación de conjuntos de descriptores soluto a partir de medidas cromatográficas. *Journal of Chromatography A*, 1037:29–47. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.004>
- Abraham, M. H., & Zhao, Y. H. (2004) Determinación de descriptores de solvatación para especies iónicas: Acidez y basicidad de la unión al hidrógeno. *Revista de Química Orgánica*, 69:4677–4685. <https://doi.org/10.1021/jo049766y>
- Aldenberger, T., y Jaworska, J. S. (2000) Incertidumbre de la concentración peligrosa y fracción afectada para las distribuciones normales de sensibilidad a las especies. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 46:1–18. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1869>
- APHA. (2017) Método 8010e (cuadro 8010-i). Métodos estándar para el examen del agua y las aguas residuales. Washington, DC: Autor.
- AVMA. (2013) Directrices para la eutanasia de los animales (2013 ed.). Schaumburg, IL: Asociación Médica Veterinaria Americana.
- Belanger, S., Sanderson, H., Fisk, P., Schaeffers, C., Mudge, S., Willing, A., ... Toy, R. (2009) Evaluación del riesgo ambiental de los alcoholes alifáticos de cadena larga. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 72:1006–1015.
- Belanger, S. E., Dorn, P.B., Juguete, R., Boeije, G., Marshall, S. J., Viento, T., ... Zeller, D. (2006) Evaluación del riesgo acuático de etoxilatos alcohólicos en América del Norte y Europa. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 64:85–99. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.11.003>
- Boeije, G.M., Cano, M. L., Marshall, S. J., Belanger, S. E., Van Compernelle, R., Dorn, P.B., ... Wind, T. (2006) Relaciones cuantitativas estructura-actividad de ecotoxicidad para mezclas de etoxilatos de alcohol basadas en predicciones de toxicidad específicas de la sustancia. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 64:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.009>
- Bragin, G. E., Parkerton, T. F., Redman, A. D., Letinski, D. J., Butler, J. D., Paumen, M. L., ... den Haan, K. (2016) Toxicidad crónica de hidrocarburos aromáticos policíclicos seleccionados para algas y crustáceos mediante dosificación pasiva. *Toxicología y Química Ambiental*, 35:2948–2957. <https://doi.org/10.1002/etc.3479>
- Brown, D. (1995) Introducción a la biodegradación de tensioactivos. En D. R. Karsa & M. R. Porter (Eds.), *Biodegradabilidad de tensioactivos* (1er ed.). Dordrecht, Países Bajos: Springer Science+Business Media, B.V.. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1348-9>
- Camenzuli, L., Davis, C. W., Parkerton, T. F., Letinski, D. J., Butler, J. D., Davi, R. A., ... Lampi, M. A. (2019) Factores de bioconcentración de hidrocarburos y petroquímicos: Comprensión de procesos, incertidumbre y desempeño del modelo predictivo. *Quimiosfera*, 226:472–482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.147>
- CESIO. (2017) Recomendaciones de Cesio para la clasificación armonizada y el etiquetado de tensioactivos. Bruselas, Bélgica: Tensioactivos Europa, CEFIC.
- CSTEE. (1999) Propuesta de enfoque de "biodegradabilidad lista" para actualizar la legislación sobre detergentes. E. A. T. E. C. Comité Científico sobre Toxicidad.
- Di Toro, D.M., & McGrath, J. A. (2000) Base técnica para sustancias químicas estupefacientes y criterios aromáticos policíclicos de hidrocarburos. II. Mezclas y sedimentos. *Toxicología Ambiental y Química*, 19:1971–1982. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190804>
- Di Toro, D.M., McGrath, J. A., & Hansen, D. J. (2000) Base técnica para sustancias químicas estupefacientes y criterios aromáticos policíclicos de hidrocarburos. I. Agua y tejido. *Toxicología Ambiental y Química*, 19:1951–1970. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190803>
- Dorn, P.B., Salanitro, J. P., Evans, S. H., & Kravetz, L. (1993) Evaluar el peligro acuático de algunos tensioactivos no iónicos ramificados y lineales mediante biodegradación y toxicidad. *Toxicología y Química Ambiental*, 12:1751–1762. <https://doi.org/10.1002/etc.5620121002>
- Droge, S. T. J., Postma, J. F., & Hermens, J. L. M. (2008) Toxicidad del sedimento de un tensioactivo no iónico rápidamente biodegradable: Comparación del método de reparto en equilibrio con mediciones en agua intersticial. *Ciencia y Tecnología Ambiental*, 42:4215–4221. <https://doi.org/10.1021/es702802p>
- Droge, S. T. J., Yarza-Irusta, L., & Hermens, J. L. M. (2009) La adsorción no lineal modeladora de los etoxilatos de alcohol a sedimentos: The influence of molecular structure and sediment properties. *Environmental Science & Technology*, 43:5712–5718. <https://doi.org/10.1021/es900452p>
- EC. (2005) Detergents regulation (EC) no 648/2004. 648/2004. E. Commission. Official Journal of the European Union.
- ECHA. (2017) Capítulo r. 7b: Endpoint specific guidance. In *Guidance on information requirements and chemical safety assessment* (págs. 1–278). Helsinki, Finlandia: European Chemicals Agency.

- Endo, S., Escher, B. I., & Goss, K.-U. (2011) Capacities of membrane lipids to accumulate neutral organic chemicals. *Environmental Science & Technology*, 45:5912–5921. <https://doi.org/10.1021/es200855w>
- Endo, S., & Goss, K. U. (2014) Applications of polyparameter linear free energy relationships in environmental chemistry. *Environmental Science & Technology*, 48:12477–12491. <https://doi.org/10.1021/es503369t>
- Environment Canada. (2000) Canadian environmental protection act, 1999. Priority substance list assessment report—nonylphenol and its ethoxylates.
- Environment Canada. (2013) Canadian environmental protection act, 1999. Federal environmental quality guidelines—alcohol ethoxylates.
- EPA. (1987a) 797.1050—freshwater algal acute toxicity test. EE. UU. EPA. Fed. Reg. 50/188 (27 de septiembre de 1985); as amended Fed. Reg. 52/97 (20 de mayo de 1987).
- EPA. (1987b) 797.1300 daphnid acute toxicity test. EE. UU. EPA. Fed. Reg. 50/188 (27 de septiembre de 1985); as amended Fed. Reg. 52/97 (20 de mayo de 1987).
- EPA. (1987c) 797.1400 fish acute toxicity test. EE. UU. EPA. Fed. Reg. 50/188 (27 de septiembre de 1985); as amended Fed. Reg. 52/97 (20 de mayo de 1987).
- EPA. (2005) Aquatic life ambient water quality criteria—nonylphenol. Final. US EPA Office of Water. EPA-822-R-05-005. US Environmental Protection Agency.
- EPA. (2018) Kowwin. Washington, DC: US Environmental Protection Agency.
- Escher, B. I., Eggen, R. I. L., Schreiber, U., Schreiber, Z., Vye, E., Wisner, B., & Schwarzenbach, R. P. (2002) Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by in vitro membrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environmental Science & Technology*, 36:1971–1979. <https://doi.org/10.1021/es015844c>
- Escher, B. I., & Hermens, J. L. M. (2002) Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, qsars, and mixture effects. *Environmental Science & Technology*, 36: 4201–4217. <https://doi.org/10.1021/es015848h>
- Feijtel, T. C. J., Matthijs, E., Rottiers, A., Rijs, G. B. J., Kiewiet, A., & de Nijs, A. (1995) AIS/CESIO environmental surfactant monitoring program. Part 1: LAS monitoring study in “de-Meern” sewage-treatment plant and receiving river “Leidsche-Rijn”. *Chemosphere*, 30:1053–1066. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00003-Q](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00003-Q)
- Finney, D. (1971) Probit analysis. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Gartiser, S., Schneider, K., Schwarz, M., & Junker, T. (2017) Assessment of environmental persistence: Regulatory requirements and practical possibilities—Available test systems, identification of technical constraints and indication of possible solutions. N.C. Federal Ministry for the Environment, Building and Nuclear Safety. Dessau-Roßlau, Umweltbundesamt.
- Goss, K. U. (2006) Prediction of the temperature dependency of Henry's law constant using polyparameter linear free energy relationships. *Chemosphere*, 64:1369–1374. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.049>
- Goss, K.-U. (2005) Predicting the equilibrium partitioning of organic compounds using just one linear solvation energy relationship (LSER). *Fluid Phase Equilibria*, 233:19–22. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2005.04.006>
- Goss, K. U., & Schwarzenbach, R. P. (2001) Linear free energy relationships used to evaluate equilibrium partitioning of organic compounds. *Environmental Science & Technology*, 35:1–9. <https://doi.org/10.1021/es000996d>
- Goyer, M., Perwak J., Sivak A., & Thayer P. (1981) Human safety and environmental aspects of major surfactants (supplement).
- Greenberg, A. E., Trussell R. R., & Clesceri L.S. (1985) Standard methods for the examination of water and wastewater (16th ed.). Washington, DC: American Public Health Association. American Water Works Association. Water Pollution Control Federation.
- Gulley, D., Boelter, A., & Bergman, H. (1989) Toxstat/datasys statistical software, release 3.0. Laramie, WY: University of Wyoming, Department of Zoology and Physiology.
- Gulley, D., Boelter, A., & Bergman, H. (1990) Toxstat release 3.2. Laramie, WY: The University of Wyoming.
- Hamilton, M. A., Russo, R.C., & Thurston, R. V. (1977) Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11:714–719.
- Hodges, G., Eadsforth, C., Bossuyt, B., Bouvy, A., Enrici, M.-H., Geurts, M., ... Müller, J. (2019) A comparison of log Kow (n-octanol–water partition coefficient) values for non-ionic, anionic, cationic and amphoteric surfactants determined using predictions and experimental methods. *Environmental Sciences Europe*, 31:1.
- Horning, W.B., & Weber, C. I. (1985) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters fresh-water organisms. EPA 600, EPA. 4.
- Japertas, P., Sazonovas, A., Clarke, E. D., & Delaney, J. S. (2014) Prediction of abraham descriptors for agrochemicals.
- Kaluza, Ee.UU., & Taeger, K. (1996) Effect of chemical structure on the ecotoxicological properties of alcohol ethoxylates. *Tenside Surfactants Detergents*, 33:46–51.
- Kipka, U., & Di Toro, D. M. (2009) Technical basis for polar and nonpolar narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. III. A polyparameter model for target lipid partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:1429–1438. <https://doi.org/10.1897/08-364.1>
- Knepper, T. P., de Voogt, P., & Barcelo, D. (2003) Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- Kravetz, L., Salanitro, J. P., Dorn, P.B., & Guin, K. F. (1991) Influence of hydrophobe type and extent of branching on environmental response factors of nonionic surfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68:610–618. <https://doi.org/10.1007/BF02660164>
- Lacasse, K., & Baumann, W. (2012) Textile chemicals: Environmental data and facts. Nueva York, NY: Springer Science & Business Media.
- Lassen, C., Jensen A., Maag J., Christensen F., Kjølholt J., Jeppesen C., Mikkelsen S., & Innanen S. (2013) Survey of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. Part of the LOUS-review. Environmental project (1470).
- Litchfield, J. J., & Wilcoxon, F. (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96:99–113.
- Little, A. D. (1977) Human safety and environmental aspects of major surfactants. Report to the Soap and Detergent Association.
- Loewe, S. (1953) The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittel-Forschung—Drug Research*, 3:285–290.
- Madsen, T., Boyd, H.B., Nylén, D., Pedersen, A. R., Petersen, G. I., & Simonsen, F. (2001) Environmental and health assessment of substances in household detergents and cosmetic detergent products. Environmental Project, 615:221.
- Marcomini, A., Pojana, G., Carrer, C., Cavalli, L., Cassani, G., & Lazzarin, M. (2000a) Aerobic biodegradation of monobranched ali-phatic alcohol polyethoxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:555–560. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190306>
- Marcomini, A., Zanette, M., Pojana, G., & Suter, M. J. F. (2000b) Behavior of aliphatic alcohol polyethoxylates and their metabolites under standardized aerobic biodegradation conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19: 549–554. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190301>

- Markarian, R. K., Hinman, M. L., & Targia, M. E. (1990) Acute and chronic aquatic toxicity of selected nonionic surfactants. Artículo presentado en the Proceedings of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Arlington, VA.
- Markarian, R. K., Pontasch, K. W., Peterson, D. R., & Hughes, A. I. (1989) Comparative toxicities of selected surfactants to aquatic organisms. In Review and analysis of environmental data on Exxon surfactants and related compounds. East Millstone, NJ: ExxonMobil Biomedical Sciences.
- Mausner, M., Benedict, J., Booman, K., Brenner, T., Conway, R., Duthie, J., ... Shewmaker, J. (1969) The status of biodegradability testing of nonionic surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 46:432–440. <https://doi.org/10.1007/BF02544362>
- McGrath, J. A., & Di Toro, D. M. (2009) Validation of the target lipid model for toxicity assessment of residual petroleum constituents: Monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:1130–1148. <https://doi.org/10.1897/08-271.1>.
- McGrath, J. A., Fanelli, C. J., Di Toro, D.M., Parkerton, T. F., Redman, A. D., Paumen, M. L., ... den Haan, K. (2018) Re-evaluation of target lipid model-derived HC5 predictions for hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37:1579–1593. <https://doi.org/10.1002/etc.4100>
- McGrath, J. A., Parkerton, T. E., Hellweger, F. L., & Di Toro, D.M. (2005) Validation of the narcosis target lipid model for petroleum products: Gasoline as a case study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24:2382–2394. <https://doi.org/10.1897/04-387r.1>
- McGrath, J. A., Parkerton, T. F., & Di Toro, D.M. (2004) Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:2503–2517. <https://doi.org/10.1897/03-538>
- Miller, W., Greene, J., y Shiroyama T. (1978) The Selenastrum capricornum printz algal assay bottle test. Office of research & development, us environmental protection agency, Corvallis, or, EPA-600/9-78-018.
- Morrall, D.D., Belanger, S. E., & Dunphy, J.C. (2003) Acute and chronic aquatic toxicity structure-activity relationships for alcohol ethoxylates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:381–389. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00088-x](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00088-x)
- Müller, M. T., Zehnder, A. J., & Escher, B. I. (1999) Liposome—Water and octanol—Water partitioning of alcohol ethoxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18:2191–2198. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181011>
- NRC. (1985) Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academies Press.
- NRC. (2010) Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academies Press.
- OCDE (1992a). Test no. 203: Fish, acute toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>.
- OCDE. (1992b) Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
- OCDE. (1998) OECD Principles on Good Laboratory Practice, OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 1. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264078536-en>.
- OCDE. (2004) Test no. 202: Daphnia sp. Acute immobilisation test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.
- OCDE. (2011) Test no.201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-es>.
- OCDE. (2012) Test no.305: Bioaccumulation in fish: Aqueous and dietary exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264185296-es>.
- OCDE. (2014) Test no.310: Ready biodegradability - CO2 in sealed vessels (headspace test), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264224506-es>.
- P&G. (2015) Fatty alcohol ethoxylates technical data sheets—Asia Pacific region (ae-2a-ae-9a). Cincinnati, OH: P & G Chemicals.
- Platts, J. A., Abraham, M. H., Butina, D., & Hersey, A. (2000) Estimation of molecular linear free energy relationship descriptors by a group contribution approach. 2. Prediction of partition coefficients. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 40: 71 – 80.
- Platts, J. A., Butina, D., Abraham, M. H., & Hersey, A. (1999) Estimation of molecular linear free energy relation descriptors using a group contribution approach. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 39:835–845.
- Posthuma, L., Suter II, G. W., & Traas, T. P. (2001) Species sensitivity distributions in ecotoxicology. CRC Press.
- R Development Core Team. (2018) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rapaport, R. A., & Eckhoff, W. S. (1990) Monitoring linear alkyl benzene sulfonate in the environment—1973–1986. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:1245–1257. <https://doi.org/10.1002/etc.5620091003>
- Ratkowsky, D.A. (1993) Principles of nonlinear regression modeling. *Journal of Industrial Microbiology*, 12:195–199.
- Redman, A. D., McGrath, J. A., Febbo, E. J., Parkerton, T. F., Letinski, D. J., Connelly, M. J., ... Di Toro, D.M. (2007) Application of the target lipid model for deriving predicted no-effect concentrations for wastewater organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26:2317–2331. <https://doi.org/10.1897/07-083R.1>
- Redman, A.D., Parkerton, T. F., Comber, M. H. I., Paumen, M. L., Eadsforth, C. V., Dmytrasz, B., ... Djemel, N. (2014a) Petrorisk: A risk assessment framework for petroleum substances. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10:437–448. <https://doi.org/10.1002/ieam.1536>
- Redman, A. D., Parkerton, T. F., McGrath, J. A., & Di Toro, D.M. (2012) Petrotox: An aquatic toxicity model for petroleum substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31:2498–2506. <https://doi.org/10.1002/etc.1982>
- Redman, A. D., Parkerton, T. F., Paumen, M. L., Butler, J. D., Letinski, D. J., & den Haan, K. (2017) A re-evaluation of petrotox for predicting acute and chronic toxicity of petroleum substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36:2245–2252. <https://doi.org/10.1002/etc.3744>
- Redman, A. D., Parkerton, T. F., Paumen, M. L., McGrath, J. A., den Haan, K., & Toro, D.M. (2014b) Extension and validation of the target lipid model for deriving predicted no-effect concentrations for soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33:2679–2687. <https://doi.org/10.1002/etc.2737>
- Roberts, D., y Marshall, S. (1995) Application of hydrophobicity parameters to prediction of the acute aquatic toxicity of commercial surfactant mixtures. SAR and QSAR in Environmental Research, 4:167–176.
- Roberts, D. W. (1991) Qsar issues in aquatic toxicity of surfactants. *Science of the Total Environment*, 109:557–568. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90209-w](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90209-w)
- Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:241–248. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150303>

- SAS. (2013) SAS 9.4 [Computer software], Cary, NC: Instituto SAS.
- Sasol. (2018) Alcohol ethoxylates marketing brochure versatile alternatives for technical applications. Johannesburg, Sudáfrica: Sasol Performance Chemicals.
- Servos, M. R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34: 123–177. <https://doi.org/10.2166/wqj.1999.005>
- Shell. (2018) Neodol product guide for alcohols, ethoxylates, and derivatives. Houston, TX: Shell Chemical Company.
- Stephan, C. E. (1977) Methods for calculating an LC 50. *Aquatic toxicology and hazard evaluation*. West Conshohocken, PA.: ASTM International.
- Talmage, S. S. (1994) Environmental and human safety of major surfactants: Alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Peajes, J., Haller, M., Labee, E., Verweij, M., & Sijm, D. T. (2000) Experimental determination of bioconcentration of the nonionic surfactant alcohol ethoxylate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:646–653. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190317>
- Ulrich, N., Endo, S., Brown, T. N., Watanabe, N., Bronner G., Abraham M. H., & Goss, K. U. (2017) Ufz-lser database v 3.2 [internet].
- UN. (2017) Globally harmonized system of classification and label-ling of chemicals (GHS). Nueva York, NY: Autor:
- van de Plassche, E. J., de Bruijn, J. H. M., Stephenson, R. R., Marshall, S. J., Feijtel, T. C. J., & Belanger, S. E. (1999) Predicted no-effect concentrations and risk characterization of four surfac-tants: Linear alkyl benzene sulfonate, alcohol ethoxylates, alcohol ethoxylated sulfates, and soap. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18:2653–2663. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181135>
- Waters, J., & Feijtel, T. C. J. (1995) AIS<sup>+</sup>/CESIO<sup>+</sup> environmental surfactant monitoring programme: Outcome of 5 national pilot studies on linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Chemosphere*, 30: 1939–1956. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00074-i](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00074-i)
- Wenzel, A., Böhmer, W., Müller, J., Rüdél, H., & Schröter-Kermani, C. (2004) Retrospective monitoring of alkylphenols and alkylphenol monoethoxylates in aquatic biota from 1985 to 2001: Results from the German environmental specimen Bank. *Environmental Science & Technology*, 38:1654–1661. <https://doi.org/10.1021/es035032b>
- Wickbold, R. (1972) Zur bestimmung nichtionischer tenside in fluss-und abwasser. *Tenside detergents*, 9:173–177.
- Wind, T., & Belanger, S. (2006) Acute and chronic toxicity of alcohol ethoxylates to the green alga, *Desmodesmus* (= *Scenedesmus*) *subspicatus*, and the subsequent development of structure activity relationships. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76:218–225. <https://doi.org/10.1007/s00128-006-0910-5>
- Wong, D. C. L., Dorn, P. B., & Chai, E. Y. (1997) Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:1970–1976. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160929>