

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

**Coordinación de Tratamiento y Calidad del Agua
Subcoordinación de Potabilización**

**Residuos de tratamiento de emergentes: remoción de
contaminantes emergentes de importancia sanitaria y
ambiental; disminución del impacto sanitario y
ambiental de los desechos generados
(TC1104.1)**

**Juana E. Cortés Muñoz
Silvia L. Gelover Santiago
César G. Calderón Mólgora
Leticia Montellano Palacios
Gabriela E. Moeller Chávez**

**Jesús Linares Ocampo
Yadira Solís Arcos
Areli Gómez Rojas**

2011



RESUMEN EJECUTIVO

Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, el cuidado personal e higiene, han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable desde principios del siglo XIX, hay que añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta.

En 2010, el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), apoyó el desarrollo de un proyecto para realizar pruebas de tratabilidad en el laboratorio de membrana de la Subcoordinación de Potabilización. Se evaluaron tres tipos de membranas de nanofiltración, concluyendo que este proceso es adecuado para potabilización del agua, ya que más del 95% de los fármacos probados fueron removidos, quedando como resultado un agua de rechazo o salmuera con alto contenido de fármacos, iones, hormonas, nonilfenoles y sus etoxilatos entre otras moléculas utilizadas para las pruebas. Dado que esta agua de rechazo o salmuera tiene concentraciones altas de contaminantes, su disposición o liberación al ambiente, sin un tratamiento previo, tendría un impacto negativo cuya magnitud y dimensión son difícilmente predecibles, ya que la dosis umbral para exposiciones ambientales a este tipo de compuestos no está definida y menos aún para los metabolitos o subproductos de degradación.

Por lo anterior los objetivos del presente proyecto son: a) explorar la aplicación de dos procesos de tratamiento para reducir la concentración de contaminantes emergentes potencialmente tóxicos contenidos en los residuos que se generan en la potabilización del agua mediante procesos de nanofiltración y, b) explorar la utilidad de la toxicología computacional y la actual aplicación de la metodología de evaluación de riesgos ambientales y a la salud pública, para predecir los efectos adversos de contaminantes emergentes en organismos no blanco

Procesos avanzados de oxidación para tratamiento de salmueras

Los procesos avanzados de oxidación, PAOs, representan actualmente la mejor opción para la remoción de fármacos y productos de cuidado personal de matrices acuosas. La acción del radical hidroxilo, especie altamente oxidante, característica de estos procesos, permite la oxidación de una amplísima gama de moléculas orgánicas, por lo que representa una excelente opción de tratamiento.

En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de la aplicación de los PAOs al tratamiento de agua contaminada con compuestos emergentes en concentraciones de mg/L o

bien $\mu\text{g/L}$. Las técnicas más aplicadas son la oxidación con ozono, con el sistema Fenton, foto-Fenton y por fotocatalisis heterogénea con TiO_2 .

Tratándose de matrices como agua subterránea, caracterizadas en general por un bajo contenido en sales y materia orgánica una opción elegante y efectiva es el uso de la fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio inmovilizado.

Como parte de este trabajo se realizaron algunos experimentos con muestras sintéticas utilizando carbamazepina como molécula modelo en agua deionizada, y dióxido de titanio inmovilizado como catalizador en un colector solar de tipo parabólico compuesto. La mejor degradación se logró para una disolución de 150 ng/L del fármaco, aunque se exploró hasta 2000 ng/L. Después de 3h de exposición a la radiación solar la concentración de carbamazepina disminuyó en un 90%, es decir de 150 ng/L a sólo 15 ng/L.

En otra prueba, este antiepiléptico fue degradado en un 75%, en presencia de una mezcla de otros cinco fármacos, la carbamazepina disminuyó de 1350 ng/L a 340 ng/L, el DEET disminuyó de 6.45 a 2.87 ng/L (56% de remoción), la eritromicina pasó de 0.908 a 0.357 ng/L (remoción de 61%) y el sulfametoxazol se degradó en un 84% al disminuir su concentración de 20.3 ng/L a 3.2 ng/L.

Para poder estimar la aplicabilidad del proceso al tratamiento de salmueras generadas en los sistemas de membranas, será necesario realizar la evaluación de muestras reales para descartar posibles interferencias por la posible presencia de cationes, pero especialmente aniones en altas concentraciones. Por lo pronto, estos resultados preliminares, indican que esta metodología podría ser funcional, sin embargo hacen falta estudios para alcanzar el escalamiento que se requiere para el trabajo en una planta potabilizadora real.

Herramientas computacionales para la evaluación de riesgos sanitarios y ambientales

El capítulo de herramientas computacionales o de toxicidad *in silico*, para la evaluación de riesgos a la salud, si bien no es una revisión bibliográfica exhaustiva, sí constituye una síntesis de temas relevantes en la evolución de las pruebas de toxicidad en el contexto de la evaluación de riesgos a la salud humana asociados con la exposición a compuestos químicos ambientales, partiendo de la importante interconexión que hay entre la salud pública, las ciencias ambientales, la toxicología, la farmacología y, las ciencias emergentes como son la bioinformática, quimioinformática, genómica, proteómica y metabolómica para el mejor entendimiento de la influencia que los compuestos químicos presentes en el ambiente tienen sobre la salud humana.

Hay miles de compuestos químicos necesarios para la vida cotidiana, crecimiento económico, bienestar y salud, que incluyen químicos industriales, plaguicidas, medicamentos, productos para la higiene y cuidado personal, así como otras moléculas farmacológicamente activas e ingredientes inertes, que constituyen una fuente ambiental de exposición humana a xenobióticos potencialmente significativa y para los cuales la información toxicológica es limitada o simplemente no existe [Judson, *et al.*, 2010], por tanto, se carece de información fundamental para fijar estándares regulatorios cuyo objetivo es la protección de la salud pública y de los ecosistemas.

Las actuales estrategias de prueba de toxicidad descansan principalmente en la observación de respuestas adversas de los animales de laboratorio tratados con altas dosis de los compuestos químicos de interés. Las inferencias acerca de los riesgos para las poblaciones humanas basadas en estas observaciones, requieren extrapolaciones inciertas, primero de altas dosis a los niveles ambientales (usualmente varios órdenes de magnitud por debajo de las probadas en el laboratorio), y segundo la extrapolación de animales a humanos [Andersen y Krewski, 2009].

Estos huecos en la información y el conocimiento, se deben en gran medida a factores éticos y, a los altos costos y períodos de tiempo requeridos para llevar a cabo estudios epidemiológicos y ensayos en animales. Evidentemente los ensayos en modelos animales e *in vitro* proporcionan información valiosa; sin embargo, ésta es limitada en cuanto a los mecanismos de acción y por ende de las vías celulares que podrían llevar a la toxicidad en humanos. Dicha información, mecanista, es clave para ir más allá de los actuales paradigmas en la estimación de los riesgos a la salud humana a niveles de exposición realistas [Judson, *et al.*, 2010].

El Consejo Nacional de Investigación (NRC, por sus siglas en inglés) de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, actualmente promueve la transformación de las pruebas de toxicidad a través del entendimiento de las vías o rutas moleculares; en respuesta, diversos grupos de investigación han acelerado los esfuerzos para aplicar enfoques de tamizaje con un alto flujo y contenido de información para la priorización de compuestos químicos y pruebas de toxicidad, lo cual resulta en la disponibilidad explosiva de datos de ensayos de toxicidad *in vitro* [Cohen, 2009] y posiblemente *in silico*.

Entre las varias opciones de ensayos de toxicidad, el Comité en Pruebas de Toxicidad y Evaluación de Riesgos Ambientales (Comité) del NRC, intenta definir un paradigma de evaluación de riesgos que permita:

- a) Lograr una amplia cobertura de compuestos químicos, mezclas, resultados y estadíos de vida
- b) Reducir los costos y tiempos requeridos para llevar a cabo las pruebas de toxicidad

- c) Desarrollar bases científicas más robustas para evaluar efectos a la salud asociados con químicos ambientales
- d) Minimizar el uso y sufrimiento de animales en los ensayos o pruebas de toxicidad

En este entorno, el Comité prevé el uso de los métodos computacionales y toxicología *in silico*, en la fase de caracterización de los compuestos químicos a evaluar, para estimar o predecir sus propiedades fisicoquímicas y si es posible sus potencialidades toxicológicas [Andersen y Krewski, 2009]. Esto es, la aplicación de modelos matemáticos y de cómputo para predecir el efecto de los agentes ambientales y dilucidar la cascada de eventos que propician una respuesta adversa [NRC, 2006].

Actualmente, es posible relacionar estructuras moleculares con actividad biológica, esto es relaciones estructura actividad (SAR, por sus siglas en inglés) con resultados considerados de alta calidad y capacidad predictivas [Valleverdú, 2005]. Asimismo, los sistemas expertos y la existencia de bases de datos en red y coordinadas, está dando lugar a un alto flujo de información disponible al público. Los datos se localizan e interrelacionan fácilmente.

Se concluye, mediante la aplicación exploratoria de ToxTree y OpenTox, para identificar la peligrosidad de moléculas como los etoxilatos de nonilfenol ramificados, que estas herramientas son amigables y a manera de ejemplo, fueron un elemento importante para soportar la priorización de contaminantes orgánicos presentes en un acuífero influido por agua residual utilizada en el riego agrícola, lo cual lleva a la necesidad de: a) implementar un estudio de calidad del agua más detallado y específico para contaminantes emergentes; b) pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios de caracterización de la exposición humana a contaminantes emergentes y, c) necesidad de revisar el actual esquema normativo para reúso y reciclamiento del agua en México.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN EJECUTIVO	
Procesos avanzados de oxidación para tratamiento de salmueras.....	i
Herramientas computacionales para la evaluación de riesgos sanitarios y ambientales	ii
TABLA DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1 ANTECEDENTES	1
2 OBJETIVOS Y RESULTADOS ESPERADOS.....	4
2.1 Objetivos.....	4
2.2 Resultados esperados.....	4
3 METODOLOGÍA GENERAL.....	5
3.1 Estudios del estado del arte	5
3.1.1 Procesos de tratamiento de aguas de rechazo o salmueras, con énfasis en procesos de oxidación avanzada	5
3.1.2 Herramientas computacionales aplicables a la evaluación de riesgos sanitarios y ambientales.....	5
3.1.3 Pruebas de tratabilidad	5
4 TRATAMIENTO DE AGUAS DE RECHAZO O SALMUERAS, CON ÉNFASIS EN PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA	7
4.1 Introducción	7
4.2 Tecnologías disponibles para control y disposición de residuos generados en la potabilización del agua mediante procesos de membrana.....	8

4.3	Procesos de oxidación avanzada	9
4.3.1	Ozonación	12
4.3.2	Fenton	12
4.3.3	Foto-Fenton	14
4.3.4	Fotocatálisis con semiconductor	15
4.4	Procesos de adsorción y procesos combinados	18
4.4.1	Tecnologías de separación electroquímica	19
4.4.2	Tecnologías de oxidación electroquímica	19
4.4.3	Tecnologías electroquímicas basadas en la química del reactivo de Fenton	20
4.4.4	Fotoelectrocatalisis	20
4.5	Nuevas tendencias	20
4.5.1	Plasma no térmico	20
4.5.2	Proceso avanzado de oxidación por plasma	21
4.5.3	Nanotubos de carbono	22
4.5.4	Dendrimeros	22
4.5.5	Membranas nanoreactivas	24
4.5.6	Aplicación de procesos de oxidación avanzada para la eliminación de contaminantes emergentes	25
4.6	Aplicación práctica de la fotocatalisis. El caso de la carbamazepina	29
4.6.1	Antecedentes	29
4.6.2	Metodología	32
4.6.2.1	Materiales y reactivos	32

4.6.2.2	Concentrador autónomo para la degradación de carbamazepina	33
4.6.2.3	Cuantificación de carbamazepina	35
4.6.2.4	Muestra sintética de fármacos para tratamiento fotocatalítico.	39
4.6.3	Resultados	40
4.6.3.1	Estudio de la oxidación fotocatalítica de carbamazepina.....	40
4.6.3.2	Efecto de la recirculación y de la fotólisis	40
4.6.3.3	Tratamiento de una muestra sintética en el concentrador solar.....	44
4.6.3.4	Conclusiones	44
4.7	Necesidades de investigación y conclusiones	46
5	HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS SANITARIOS Y AMBIENTALES. ESTADO DEL ARTE.....	47
5.1	Introducción	47
5.2	Las pruebas de toxicidad en el contexto de riesgo, protección de la salud humana y el ambiente.....	50
5.3	Toxicología computacional o <i>in silico</i> -métodos de no-ensayo	58
5.3.1	GENERALIDADES.....	59
5.3.1.1	Factores que favorecen el desarrollo herramientas computacionales y de la toxicología <i>in silico</i> para la evaluación de riesgos a la salud humana y el ambiente	62
5.3.1.2	VALIDACIÓN DE MÉTODOS.....	63
5.3.1.3	Ventajas y limitaciones de los métodos <i>in silico</i>	66
5.3.2	Relaciones estructura actividad.....	67
5.3.2.1	Conceptos básicos en las relaciones estructura actividad	68
5.3.2.2	Métodos	72

5.3.2.3	Descriptores	75
5.3.2.4	Análisis de Hansch y Fujita	80
5.3.2.5	Método de Nys y Rekker	83
5.3.2.6	Modelos Free-Wilson o <i>de novo</i>	85
5.3.2.7	Métodos semicuantitativos	86
5.3.2.8	Metodologías QSAR 3D	88
5.3.3	Toxicocinética, metabolismo de xenobióticos y alertas estructurales	90
5.3.4	Modelación biocinética e integración de datos	92
5.4	Estrategias y alternativas que incluyen pruebas <i>in silico</i> para la evaluación de riesgos toxicológicos	93
5.4.1	Aspectos éticos y científicos para establecer métodos alternativos a los ensayos en animales para evaluar la toxicidad de compuestos químicos en humanos	93
5.4.2	Cultivos celulares	96
5.4.3	Modelos animales no-mamíferos	97
5.4.4	Tecnologías de alto desempeño	98
5.4.4.1	Pruebas de toxicidad de alto desempeño.....	99
5.4.4.2	Estrategias integrales de prueba.....	100
5.4.5	Esquemas integrales para evaluar toxicidad	101
5.4.5.1	Visión del Consejo Nacional de Ciencias de Estados Unidos.....	101
5.4.5.2	Prueba integral de toxicidad ERGATT/CFN	103
5.4.5.3	Esquema propuesto por Blaauboer y colaboradores.....	103
5.4.5.4	Aplicación de una estrategia integrada de prueba al programa de tamizaje de disrupción endocrina de la USEPA	105

5.5	La ciencia de la exposición.....	110
5.6	Evolución de la toxicología regulatoria	112
5.6.1	Estados Unidos	113
5.6.2	Canadá	117
5.6.3	Australia.....	118
5.6.4	Organización para la cooperación y desarrollo económicos.....	119
5.6.5	Unión Europea	121
5.6.6	El uso de SARs y QSARs con fines regulatorios.....	123
5.7	Fuentes de información y bases de datos para la modelación predictiva	126
5.7.1	El programa ToxCast de la USEPA.....	131
5.7.2	Programa OpenTox.....	135
5.7.3	ToxTree.....	136
5.7.4	Identificación de la peligrosidad de compuestos orgánicos presentes en agua subterránea influida por el uso de aguas residuales en el riego agrícola.....	138
5.8	CONCLUSIONES	143
6	BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 4.1. Etapas iniciales en el proceso de descomposición fotocatalítica de sustancias orgánicas contaminantes, con dióxido de titanio.....	16
Fig. 4.2. Esquema de reactor de oxidación por plasma	21
Fig. 4.3. Nanotubos de carbono de pared sencilla y de pared múltiple	23
Fig. 4.4. Representación de dendrímeros.....	24
Fig. 4.5. Vías de degradación de carbamazepina mediante Fotocatálisis con TiO ₂	32
Fig. 4.6. Esquema del equipo utilizado para las prueba de tratabilidad	34
Fig. 4.7. Fotografías de los fotorreactores (izq.) y detalle del catalizador inmovilizado sobre vidrios Pyrex (der.) en un arreglo sobre una varilla de vidrio a manera de soporte.....	34
Fig. 4.8. Curva de calibración para la cuantificación de carbamazepina en agua	38
Fig. 4.9. Modificación de la concentración de CBZ por efecto de la recirculación	41
Fig. 4.10. Resultados de la prueba para determinar el efecto de la fotólisis sobre CBZ.....	41
Fig. 4.11. Curvas de degradación a 1 h de exposición para diferentes concentraciones de CBZ	43
Fig. 4.12. Degradación de carbamazepina dependiente de la dosis.....	43
Fig. 5.1. Los objetivos de las pruebas de toxicidad en el nuevo paradigma de evaluación de riesgos a las salud humana [NRC, 2006]	49
Fig. 5.2. Componentes de las pruebas de toxicidad	52
Fig. 5.3. Respuestas biológicas observadas, resultantes de la intersección de la exposición y la función biológica [Andersen y Krewski, 2009; NRC, 2007]	53
Fig. 5.4. Visión de la componente modelación y extrapolación dosis-respuesta	56
Fig. 5.5. Visión de la componente datos de exposición y población	57
Fig. 5.6. Componentes de la evaluación de riesgo [NRC, 2007].....	58

Fig. 5.7. Intersección que da lugar a un modelo SAR.....	67
Fig. 5.8. Elementos importantes en el desarrollo de un modelo SAR con enfoque mecanicista [McKenney, <i>et al.</i> , 2000].....	68
Fig. 5.9. Matriz de datos típica para un estudio QSAR	73
Fig. 5.10. Descriptores del modelo y resultados esperados.....	73
Fig. 5.11. Representación de la constante de Hemmett	76
Fig. 5.12. Esquematización de un análisis QSAR de acuerdo con Hansch y Fujita	81
Fig. 5.13. Plot de Craig.....	86
Fig. 5.14. Ejemplo de un árbol de decisión Topliss, para un compuesto organoclorado	87
Fig. 5.15. Diagrama de flujo para la incorporación de información de ADME in silico para predicciones de actividad biológica [Madden, 2010].....	91
Fig. 5.16. El papel de los estudios <i>in vitro</i> en farmacología y toxicología [Spielmann, 2005]	95
Fig. 5.17. Construcción de los bloques del esquema europeo de pruebas de toxicidad integradas (ECITTS, por sus siglas en inglés) ERGATT/CFN [Blaauboer, <i>et al.</i> , 1999].....	104
Fig. 5.18. Esquema genérico propuesto por Blauboer y colaboradores para evaluar toxicidad de compuestos químicos [Blaauboer, <i>et al.</i> , 1999]	106
Fig. 5.19. Pruebas de toxicidad integral [Knight, 2008].....	107
Fig. 5.20. Propuesta para evaluar actividad estrogénica, androgénica y tiroidea de compuestos químicos ambientales [Willet, <i>et al.</i> , 2011].....	109
Fig. 5.21. Químicos ambientales que presentan retos de priorización para las agencias regulatorias ambientales [Dix, <i>et al.</i> , 2007]	133
Fig. 5.22. Los dominios de datos múltiples que incluye el programa de investigación ToxCast, a través de un continuo desde los modelos <i>in silico</i> a los modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> [Dix, <i>et al.</i> , 2007].....	133
Fig. 5.23. Sitio web del programa OpenTox [http://www.opentox.org/].....	135

- Fig. 5.24. Árbol de decisión en Toxtree. Los círculos rojo indican Tóxico clase III (muy tóxico), el amarillo tóxico clase II (toxicidad media) y el verde tóxico clase I (toxicidad baja)..... 136
- Fig. 5.25. Módulo para introducción de la molécula cuya peligrosidad se desea conocer..... 137
- Fig. 5.26. Identificación de la peligrosidad de un alquilfenol etoxidado ramificado a través de ToxTree, en este caso las reglas de Cramer indican que el compuesto es un tóxico Clase II . 141
- Fig. 5.27. Identificación de la peligrosidad de un alquilfenol etoxidado ramificado a través de ToxTree, en este caso las reglas de Cramer indican que el compuesto es un tóxico Clase III 142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada según uso de radiación	9
Tabla 4.2. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes	10
Tabla 4.3. Constantes de velocidad (k en $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) del radical hidroxilo en comparación con el ozono para algunos compuestos orgánicos.....	11
Tabla 4.4. Remoción de algunas sustancias orgánicas con nanotubos y carbón activado	23
Tabla 4.5. Aplicaciones de los procesos de oxidación avanzada para la remoción de contaminantes emergentes	25
Tabla 4.6. Aplicación de procesos de oxidación avanzados para la remoción de fármacos	26
Tabla 4.7. Síntesis de los principales trabajos dirigidos a la remoción de carbamazepina en agua.....	28
Tabla 4.8. Configuración de los controles, estándares y muestras en el Microtiter	37
Tabla 4.9. Concentraciones de carbamazepina estudiadas por fotocatalisis heterogénea	38
Tabla 4.10. Concentraciones de los solutos con los que se preparó la muestra sintética	39
Tabla 4.11. Datos obtenidos en el experimento de degradación de 2000 ng/L de carbamazepina	42

Tabla 4.12. Concentraciones de fármacos en la muestra sintética, antes y después del tratamiento por fotocatalisis heterogénea.....	44
Tabla 5.1. Herramientas para pruebas de toxicidad y su aplicación en la evaluación de riesgos	54
Tabla 5.2. Áreas de aplicación de la toxicología computacional y componentes de las pruebas de toxicidad	54
Tabla 5.3. Factores que influyen en la toxicidad de compuestos orgánicos e inorgánicos.....	69
Tabla 5.4. Tipos de información incluida en las aproximaciones de modelación <i>in silico</i>	74
Tabla 5.5. Descriptores moleculares (propiedades fisicoquímicas) que rigen la magnitud del efecto adverso o toxicidad	75
Tabla 5.6. Tipos de datos biológicos utilizados en el análisis QSAR	80
Tabla 5.7. Ventajas y limitaciones de los ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	96
Tabla 5.8. Ventajas y limitaciones de las pruebas de toxicidad en modelos animales no-mamíferos	98
Tabla 5.9. Ventajas y limitaciones de las pruebas de toxicidad de alto desempeño	99
Tabla 5.10. Ventajas y limitaciones de las estrategias de prueba integrales.....	100
Tabla 5.11. Opciones para futuras estrategias de pruebas de toxicidad.....	101
Tabla 5.12. Bloques que componen el esquema europeo de la estrategia integral de pruebas de toxicidad ERGATT/CFN	103
Tabla 5.13. Pruebas de la Etapa 2 atribuidas al EDSP.....	107
Tabla 5.14. Marco conceptual de la OECD para el tamizaje de disruptores endocrinos (actualizado a 2002).....	110
Tabla 5.15. Herramientas para la evaluación de la exposición, tecnologías y actividades para integrar a la investigación en salud humana y ambiente.....	111
Tabla 5.16. Principales Agencias y leyes para el control de productos químicos.....	118

Tabla 5.17. Marco del uso de los modelos QSAR con fines regulatorios para predecir efectos a la salud humana.....	124
Tabla 5.18. Criterios de identificación de sustancias persistentes, bioacumulativas y tóxicas (PBT) y muy persistentes y muy bioacumulativas (vPvB).....	125
Tabla 5.19. Uso de QSARs para predicción de transformación y destino ambiental con fines regulatorios	125
Tabla 5.20. Bases de datos de toxicidad con potencial para uso en la toxicología <i>in silico</i>	126
Tabla 5.21. Una lista no exhaustiva de sistemas expertos para predecir toxicidad.....	127
Tabla 5.22. Algunas herramientas de programación disponibles para formar categorías químicas	129
Tabla 5.23. Ejemplos de tamizaje biológico y quimioinformática relevantes para el programa ToxCast.....	131
Tabla 5.24. Ensayos y criterios de selección para ToxCast.....	134
Tabla 5.25. Identificación de la peligrosidad de compuestos orgánicos detectados en fuentes de abastecimiento subterráneas influidas por el uso agrícola de agua residual cruda o parcialmente tratada.....	138
Tabla 5.26. Compuestos fenólicos cuya peligrosidad se identificó mediante No. CAS o editando la estructura en el programa.....	140

1 ANTECEDENTES

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico así como del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, el cuidado personal e higiene, han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en les posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable desde principios del siglo XIX, hay que añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta [Barceló y López de Alda, s/f]. En México, la normativa existente en materia de contaminación química del agua ha sido hasta el momento insuficiente para dar una solución al problema y, la creciente demanda de agua así como la constante generación de conocimiento sobre nuevos contaminantes potencialmente peligrosos, dejan clara la necesidad de seguir investigando y modificar paradigmas en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana, a la vida silvestre y el medio ambiente en general, conseguir un uso sostenible del recurso hídrico y atenuar los efectos del cambio climático.

Debido a esto, durante 2009 y 2010, en el IMTA se llevaron a cabo proyectos relacionados con los llamados contaminantes emergentes en agua para consumo. Mediante trabajo de gabinete, se cubrieron temas como: riesgos sanitarios y ambientales, normatividad en el ámbito nacional e internacional, transformación y transporte en el ambiente, estudios de caso, técnicas de monitoreo y análisis, y sistemas de tratamiento para remoción de este tipo de contaminantes en fuentes de abastecimiento. En una segunda etapa, se llevaron a cabo pruebas de tratabilidad en el laboratorio, se evaluaron tres tipos de membranas de nanofiltración, concluyendo que este proceso es adecuado para potabilización del agua, ya que más del 95% de los fármacos probados fueron removidos, quedando como resultado un agua de rechazo o salmuera con alto contenido de fármacos, iones, hormonas, nonilfenoles y sus etoxilatos entre otras moléculas utilizadas para las pruebas.

Dado que esta agua de rechazo o salmuera tiene concentraciones altas de contaminantes, su disposición o liberación al ambiente, sin un tratamiento previo, tendría un impacto negativo cuya magnitud y dimensión son difícilmente predecibles, ya que si bien son numerosos los trabajos que se están realizando para conocer cuál es la toxicidad de los diferentes compuestos catalogados como contaminantes emergentes, la definición de la dosis tóxica no está

establecida para compuestos concretos y menos aún para los metabolitos o subproductos de degradación.

Los efectos pueden resultar en problemas tales como disrupción endocrina para organismos acuáticos, alteración de la flora y fauna del suelo, y efectos endocrinos, neurológicos y sistémicos en humanos, aves, mamíferos y reptiles. Estos problemas sanitarios y ambientales, ponen de manifiesto la necesidad de evaluar procesos de tratamiento que favorezcan la descomposición de este tipo de contaminantes a moléculas química y biológicamente inactivas (no tóxicas) y que tampoco tengan impacto sobre el medio físico en el cual serán dispuestos los residuos.

En la literatura, se reportan tecnologías diversas para el tratamiento de aguas de rechazo o salmueras, destacando los procesos de oxidación avanzados, que pueden aplicarse solos o combinados ya sea entre sí o bien con otros métodos convencionales. En términos generales, estos métodos se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes, y han sido utilizados en países industrializados para el tratamiento de efluentes contaminados con moléculas orgánicas persistentes y emergentes, suelos y aire.

Por otro lado, considerando los huecos en el conocimiento sobre los efectos tóxicos asociados con la exposición crónica a este tipo de contaminantes, se analizaron metodologías de evaluación de riesgos sanitarios y ambientales, basadas en la propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, y si bien se concluyó que son aplicables (con algunas modificaciones) a México, se presentan algunas limitaciones en cuanto a la necesidad de la información necesaria para alimentar los modelos y estimar cocientes de peligro.

En Estados Unidos, en 2007, el Consejo Nacional de Investigación (NRC, por sus siglas en inglés), publicó el informe "*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*" (*Pruebas de toxicidad en el siglo XXI: Una visión y una estrategia*), en el que el grupo de expertos que analizó el problema, demanda una toxicología transformadora para pasar "de un sistema basado solamente en pruebas completas en animales a uno basado principalmente en métodos *in vitro* que evalúe los cambios en los procesos biológicos utilizando células, líneas celulares o componentes celulares, preferiblemente de origen humano" [NRC, 2007]

Con el apoyo de la nueva tecnología, en Estados Unidos se formó en 2010 el grupo Tox21, integrado por el Programa Nacional de Toxicología (NTP), el Centro Nacional de Genómica Química (NCGC) y la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA), con la misión de modificar los actuales protocolos para las pruebas de toxicidad. Específicamente, buscan: a) identificar nuevos mecanismos de actividad química en las células; b) priorizar las

sustancias químicas que aún no han sido probadas para realizar evaluaciones más amplias y, c) desarrollar mejores modelos para predecir la respuesta humana a las sustancias tóxicas.

El resultado que se espera de este grupo son métodos de ensayo para las pruebas de toxicidad científicamente y económicamente más eficientes y, modelos para la evaluación de riesgos a la salud que se basen más en sistemas biológicos. Como consecuencia, también deberá haber una reducción o sustitución del uso de animales en las pruebas vigentes para fines regulatorios; asimismo, se prevé que en paralelo se incremente la capacidad para evaluar la gran cantidad de productos químicos que actualmente carecen de evaluación toxicológica adecuada [NTP, NCGC, EPA, and FDA MOU, http://epa.gov/ncct/download_files/tox21/MOU_EPA-NTP-NCGC-FDA-Without-Signature-Page.pdf; Schmith, 2009].

En marzo de 2009, la USEPA publicó su agenda de Tox21, "*The U.S. Environmental Protection Agency's Strategic Plan for Evaluating the Toxicity of Chemicals*" (Plan estratégico para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas de la Agencia de Protección al Ambiente de EUA), en donde se afirma que "*la explosión de nuevas herramientas científicas en las ciencias de la computación, de la información y moleculares ofrece una gran promesa para... fortalecer las pruebas de toxicidad y los enfoques de la evaluación de riesgos.*" [Schmith, 2009].

El concepto de añadir más datos mecanísticos a la evaluación de riesgos no es nuevo. Antes de Tox21, los modelos de farmacocinética basada en la fisiología (en inglés, PBPK), la toxicogenómica y otros enfoques relacionados ya estaban llevando a cabo evaluaciones de riesgos con bases más mecanísticas. Pero esa investigación no necesariamente se traducía en cambios en las políticas de regulación que gobiernan la exposición humana [Rhombert, 2009].

De lo anterior se deduce que actualmente, están cobrando reconocimiento herramientas complementarias y aplicación de la genómica, metabolómica y probiótica (entre otras tecnologías conocidas como "omics"). Estas tecnologías junto con los ensayos *in vitro* de alto rendimiento y la toxicología *in silico*, permiten llevar a cabo evaluaciones de toxicidad para un mayor número de compuestos químicos, determinando efectos específicos y alteraciones para una amplia gama de sistemas biológicos blanco a nivel biomolecular, celular y tisular, en menor tiempo, disminuyendo considerablemente el uso de modelos animales, optimando el proceso de evaluación de riesgos abatiendo el costo de las pruebas de toxicidad.

2 OBJETIVOS Y RESULTADOS ESPERADOS

2.1 OBJETIVOS

Explorar la aplicación de dos procesos de tratamiento para reducir la concentración de contaminantes emergentes potencialmente tóxicos contenidos en los residuos que se generan en la potabilización del agua mediante procesos de nanofiltración

Explorar la utilidad de la toxicología computacional y la actual aplicación de la metodología de riesgos ambientales y a la salud pública para predecir los efectos adversos de contaminantes emergentes en organismos no blanco

2.2 RESULTADOS ESPERADOS

Estudio del estado del arte de los procesos de tratamiento, para el tratamiento de aguas de rechazo o salmueras que resultan de la potabilización del agua mediante procesos de membrana con énfasis en oxidación avanzada

Informe de resultados obtenidos en las pruebas de tratabilidad mediante oxidación avanzada para degradar los contaminantes emergentes contenidos en el rechazo de la nanofiltración

Estudio del estado del arte sobre el uso y aplicación de herramientas computacionales para la evaluación de riesgos sanitarios y ambientales

3 METODOLOGÍA GENERAL

3.1 ESTUDIOS DEL ESTADO DEL ARTE

Se llevó a cabo la revisión y análisis de información bibliográfica disponible en bases de datos, textos especializados y revistas indizadas, así como de difusión científica, literatura gris y publicitaria. Los temas a tratar fueron los siguientes:

3.1.1 PROCESOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS DE RECHAZO O SALMUERAS, CON ÉNFASIS EN PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA

- a) Introducción
- b) Medidas de control de contaminantes emergentes en el ambiente acuático
- c) Tecnologías disponibles
- d) Aplicaciones de la fotocatalisis. El caso de la carbamazepina

3.1.2 HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES APLICABLES A LA EVALUACIÓN DE RIESGOS SANITARIOS Y AMBIENTALES

- a) Introducción
- b) Herramientas computacionales, p. ej., modelos estructura-actividad (QASAR)
- c) Toxicología regulatoria
- d) Necesidades de investigación y conclusiones

3.1.3 PRUEBAS DE TRATABILIDAD

Se llevaron a cabo pruebas de tratabilidad mediante fotocatalisis en un concentrador solar para la degradación de compuestos orgánicos emergentes. La experimentación se realizó en un reactor tipo CPC, diseñado por Manuel Collares Pereira de acuerdo a las características del proyecto SOLAR SAFE WATER (Collares, 2005). De manera general, se llevó a cabo una primera prueba con carbamazepina, fármaco ampliamente utilizado y persistente en el ambiente.

En la segunda prueba, con el fin de obtener una estimación de la efectividad del proceso de oxidación fotocatalítica heterogénea, en el tratamiento de salmueras generadas por el proceso de potabilización con membranas de agua subterránea contaminada con algunos fármacos

(Cortés, *et al.*, 2011) se preparó una muestra sintética con agua deionizada y fármacos comerciales. Se analizaron de agua cruda y tratada, para su análisis en el laboratorio, mediante un sistema acoplado de cromatografía de líquidos- espectrometría de masas, en modo Positive Electropray Ionization LC-MS-MS.

Los controles de calidad para el análisis de los fármacos incluyen el análisis de un blanco, el uso de surrogados, o sustitutos, isotópicamente marcados para determinar los porcentajes de recuperación, muestras fortificadas, así como el uso de estándares internos para realizar la cuantificación.

Mayor de talle de las pruebas de tratabilidad y análisis de muestras, se describe en el capítulo 4.6.2.

4 TRATAMIENTO DE AGUAS DE RECHAZO O SALMUERAS, CON ÉNFASIS EN PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA

4.1 INTRODUCCIÓN

El tratamiento, reúso y reciclamiento del agua juegan un papel fundamental en la administración y manejo de este recurso en todos los países, especialmente en aquellos que presentan problemas de escasez. En los países industrializados se han desarrollado proyectos e investigaciones para el reúso y reciclamiento del agua con los beneficios adicionales de prevención de riesgos a la salud pública, protección de la vida acuática y de otras formas de vida silvestre; no obstante, en últimos años ha habido un creciente interés en los llamados contaminantes emergentes, entre los que se encuentran fármacos, hormonas, algunos plaguicidas, almizcles y otros compuestos orgánicos de uso industrial, que han sido detectados en aguas superficiales y ocasionalmente también en aguas subterráneas.

De acuerdo con Vystavna *et al.*, quienes presentaron datos sobre la contaminación en septiembre de 2010 en la Semana Mundial del Agua en Estocolmo (http://www.worldwaterweek.org/documents/MWW_PDF/2010/sunday/K21/Vystavna_Yuliya_et_al.pdf), la calidad de las aguas superficiales en Ucrania no cumple con los estándares nacionales de calidad y ésta se clasifica de contaminada a extremadamente contaminada, siendo una de las principales causas, la descarga no controlada de aguas residuales; lamentablemente este mismo escenario se repite en diversos países del mundo, incluyendo a México.

Por ejemplo, en el acuífero del Valle del Mezquital, localizado en el estado de Hidalgo, Méx., los datos de Jiménez, *et al.* [2008], indican contaminación por butil-bencilftalato (plastificante), dietil-hexil-ftalato, nonilfenol (tensoactivo de uso industrial), ácido salicílico, triclosán (antiséptico bucal) y los fármacos carbamazepina, ibuprofeno y naproxeno. Los autores concluyen que el suelo da tratamiento al agua y que el acuífero tiene calidad aceptable; sin embargo, recomiendan tratamiento avanzado para uso potable, cambios en la normativa e investigación de los mecanismos de transporte y remoción de contaminantes

Esta recomendación es importante por dos razones: a) algunos de los contaminantes emergentes listados tienen potencial para causar disrupción endocrina y, b) que por sus características fisicoquímicas este tipo de contaminantes no son eliminados en los tratamientos convencionales de tratamiento de aguas residuales o potabilización, y si bien las concentraciones halladas pueden ser muy bajas, del orden de los nanogramos por litro, el

desconocimiento sobre los riesgos derivados de su constante liberación al ambiente a través de diversas vías, lleva a la búsqueda de alternativas de tratamiento del agua para eliminarlos o transformarlos en moléculas que no tengan actividad farmacológica o toxicológica para humanos, organismos acuáticos y otras formas de vida silvestre.

Los procesos de membrana (ósmosis inversa y nanofiltración) y otras tecnologías emergentes para el tratamiento de agua, han mostrado ser efectivos para la eliminación de los contaminantes emergentes, sin embargo, tienen limitaciones derivadas de la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes presentes y en general de la calidad de las aguas o efluentes a tratar y presentan el problema de la disposición y tratamiento del rechazo, que es en realidad un efluente concentrado de los contaminantes presentes en el agua de alimentación.

En estos casos y cada vez con mayor frecuencia, se está recurriendo en los países industrializados al uso de las llamadas Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TAOs, PAOs). La mayoría de los PAOs pueden aplicarse a la remediación y detoxificación de aguas especiales, como es el caso de los rechazos o salmueras de procesos de membrana. Los métodos pueden usarse solos o combinados entre ellos o con métodos convencionales, pudiendo ser aplicados también a contaminantes de aire y suelos. Permiten incluso la desinfección por inactivación de bacterias y virus.

4.2 TECNOLOGÍAS DISPONIBLES PARA CONTROL Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS GENERADOS EN LA POTABILIZACIÓN DEL AGUA MEDIANTE PROCESOS DE MEMBRANA

El tratamiento y disposición de residuos o rechazos generados durante el tratamiento de agua para su potabilización, es uno de los grandes retos actuales, principalmente cuando se producen grandes volúmenes de agua para consumo humano, ya que no es ambientalmente posible o factible mezclar estos residuos concentrados, conteniendo iones y compuestos orgánicos, con otro tipo de efluentes tratados o bien en cuerpos de agua naturales.

Existen algunos métodos para manejar y disponer estos concentrados, algunos están disponibles en el mercado, en tanto que otros se encuentran en desarrollo o emergiendo. El manejo convencional del concentrado incluye descarga a un cuerpo de agua superficial, a un efluente de agua residual, inyección a pozos profundos, lagunas de evaporación, aplicación en suelo y evaporación térmica u otras tecnologías para tratar de lograr descarga cero.

Las tecnologías emergentes tienen como objetivo incrementar la recuperación de agua y por tanto minimizar el concentrado, incluye tratamiento biológico o primario de concentrados de ósmosis inversa, procesos de lodos por etapas para eliminar los compuestos de manera

controlada, evaporación, destilación y membrana, ósmosis y otros procesos de ablandamiento, pretratamiento, control de pH y oxidación avanzada.

4.3 PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA

Dado que los tratamientos convencionales eliminan sólo parcialmente fármacos, hormonas, plaguicidas y otros compuestos orgánicos de uso industrial. Las tecnologías de oxidación avanzada representan una alternativa de tratamiento.

Los procesos de oxidación avanzada son métodos oxidativos basados en la generación de radicales intermediarios; los radicales hidroxilo, extremadamente reactivos y menos selectivos que otros oxidantes. Estos radicales se producen a partir de agentes oxidantes como ozono, peróxido de hidrógeno, frecuentemente combinado con catalizadores metálicos o semiconductores y/o radiación UV.

Las tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) pueden aplicarse a la remediación y desintoxicación de aguas especiales, generalmente en pequeña o mediana escala. Los métodos pueden usarse solos o combinados entre ellos o con métodos convencionales, pudiendo ser aplicados también a contaminantes de aire y suelos.

Los (PAO), se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. Estos procesos se definen como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía, y posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica.

Los Procesos Avanzados de Oxidación se clasifican en procesos no fotoquímicos y fotoquímicos (Tabla 4.1), sea que se utilice algún tipo de radiación para complementarlos, o no. En general los procesos fotoquímicos tienden a presentar mejores eficiencias.

Tabla 4.1. Clasificación de los procesos de oxidación avanzada según uso de radiación

PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS	PROCESOS FOTOQUÍMICOS
Ozonización en medio alcalino (O_3/OH^-)	Oxidación en agua sub/y supercrítica
Ozonización con peróxido de hidrógeno ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$)	Procesos fotoquímicos
Procesos Fenton ($\text{Fe}_2^+/\text{H}_2\text{O}_2$) y relacionados	Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV)
Oxidación electroquímica	UV/peróxido de hidrógeno
Radiólisis y tratamiento con haces de electrones	UV/ozono

PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS	PROCESOS FOTOQUÍMICOS
Plasma no térmico	Foto-Fenton y relacionadas
Descarga electrohidráulica-ultrasonido	Fotocatálisis heterogénea

Fuente:

Estas tecnologías ofrecen ventajas sobre el uso de otras:

- Destruyen a los contaminantes y no sólo los cambian de fase
- Generalmente alcanzan la mineralización o completa oxidación
- Frecuentemente con un consumo menor de energía, son muy útiles para contaminantes refractarios que resisten otros métodos de tratamiento, y
- Permiten obtener productos tratables luego por métodos más económicos, como el tratamiento biológico

En cuanto a su eficiencia, los procesos involucrados poseen una mayor factibilidad termodinámica y una velocidad de oxidación muy incrementada por la participación de radicales, principalmente el radical hidroxilo, HO•. Esta especie posee propiedades adecuadas para atacar virtualmente a todos los compuestos orgánicos y reaccionar de dos a tres órdenes de magnitud más rápido que oxidantes alternativos como el O₃. La Tabla 4.2, que presenta potenciales de oxidación de distintas especies, muestra que después del flúor, el HO•, es el oxidante más enérgico y en la Tabla 4.3 se puede observar la gran diferencia en las constantes de velocidad de reacción de distintos compuestos con el radical hidroxilo y con el ozono. Sin embargo, es importante destacar que, para ser eficientes, los PAO deben generar altas concentraciones de radicales hidroxilo en estado estacionario [Doménech *et al.*, 2001].

Tabla 4.2. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes

ESPECIE	E ₀ , (V, 25 °C)	ESPECIE	E ₀ , (V, 25 °C)
Flúor	3.03	Permanganato	1.68
Radical hidroxilo	2.80	Dióxido de cloro	1.57
Oxígeno atómico	2.42	Ácido hipocloroso	1.49
Ozono	2.07	Cloro	1.36
Peróxido de hidrógeno	1.78	Bromo	1.09
Radical perhidroxilo	1.70	Yodo	0.54

Tabla 4.3. Constantes de velocidad (k en $L mol^{-1} s^{-1}$) del radical hidroxilo en comparación con el ozono para algunos compuestos orgánicos

COMPUESTO	HO•	O ₃
Alquenos clorados	$10^9 - 10^{11}$	$10^1 - 10^3$
Fenoles	$10^9 - 10^{10}$	10^3
Aromáticos	$10^8 - 10^{10}$	$1 - 10^2$
Cetonas	$10^9 - 10^{10}$	1
Alcoholes	$10^8 - 10^9$	$10^{-2} - 1$
Alcanos	$10^6 - 10^9$	10^{-2}

En su revisión, sobre degradación y métodos de remoción de antibióticos de matrices acuosas, Homem y Santos [2011], presentan un análisis a cerca de las tecnologías más aplicadas en los últimos diez años, para la eliminación de este diverso grupo de contaminantes emergentes.

Vale la pena comentar, que en su revisión concluyen que los tipos de antibióticos más estudiados en estudios de remoción de estos contaminantes emergentes son: las β -lactamas y las sulfonamidas; en contraste, la agencia de Vigilancia Europea para el consumo de antibióticos indica que los productos más prescritos en Europa fueron las β -lactamas, las lincosamidas y los macrólidos, en el mismo periodo.

Analizan los procesos de adsorción, los procesos de membrana: ósmosis inversa, nano y ultrafiltración, intercambio iónico así como los procesos avanzados de oxidación y los combinados.

Los puntos más relevantes sobre las tecnologías revisadas se sintetizan como sigue:

En el caso en que la toxicidad no sea alta para los microorganismos de los sistemas de tratamiento biológicos, estos procesos siguen siendo la mejor opción. Cuando los tratamientos convencionales resultan ineficientes para la remoción de este tipo de compuestos, la opción es el tratamiento con procesos avanzados de oxidación, PAOs. De ellas la ozonación, la oxidación con Fenton y foto-Fenton así como la fotocatalisis con semiconductor son las que se han trabajado más.

Con respecto a la cloración, los autores concluyen que esta técnica parece ser efectiva para la degradación de antibióticos presentes en matrices con bajas cargas de materia orgánica, tales como agua potable. Las velocidades de reacción son influenciadas por el pH. Esta técnica ha sido remplazada por los PAOs a fin de evitar la formación de especies halogenadas, las cuales son potencialmente carcinogénicas. A continuación se presenta información relevante sobre los procesos avanzados de oxidación.

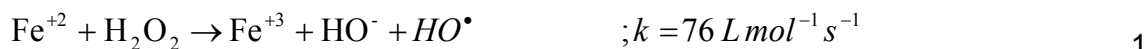
4.3.1 OZONACIÓN

Si bien la ozonación tiene la ventaja de poder aplicarse al tratamiento de corrientes con flujos y composiciones variables, el alto costo de los equipos y la energía requerida para el proceso constituyen sus principales desventajas. Varios estudios informan de su efectividad en el tratamiento para remover antibióticos. Sin embargo, se presentan bajas tasas de mineralización aún para largos tiempos de tratamiento y la ecotoxicidad de los efluentes tratados permanece casi sin cambio y algunas veces es mayor, debido a la producción de subproductos tóxicos. Por sus limitaciones económicas, no se profundiza en esta técnica.

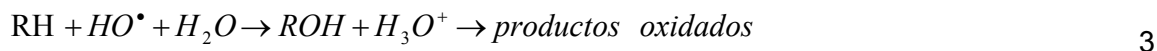
4.3.2 FENTON

La oxidación con el reactivo de Fenton es una metodología ampliamente utilizada. En la década de 1890, Henry John Horstman Fenton desarrolló el reactivo que da nombre a la metodología, que consiste en una disolución de peróxido de hidrógeno y de iones ferrosos, la cual posee propiedades fuertemente oxidantes. El reactivo de Fenton puede trabajarse en fase homogénea, lo más usual, o en fase heterogénea.

En este sistema se ha sugerido la formación del radical hidroxilo HO• por la reacción entre el peróxido y el hierro en su forma reducida Fe²⁺



Dichos radicales podían reaccionar luego por dos vías, la oxidación de Fe (II), ecuación 2 (una reacción improductiva) y el ataque a la materia orgánica (RH):

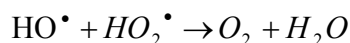


A pH < 3, la reacción es autocatalítica, [Kiwi, *et al.*, 1993; Pulgarin y Kiwi, 1996] ya que el Fe (III) descompone H₂O₂ en O₂ y H₂O a través de un mecanismo en cadena:

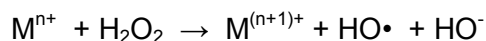


$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + HO^- + HO^\bullet$	6
$HO_2^\bullet + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO_2$	7
$HO_2^\bullet + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 + H^+$	8
$HO^\bullet + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2^\bullet$	9

Ya que es un proceso altamente efectivo en la producción de $\bullet OH$, se puede aprovechar muy bien para oxidar materia orgánica, sin embargo un exceso de iones Fe^{2+} puede ser contraproducente, ya que atrapa a la especie oxidante (ecuación 2), algo similar sucede en presencia de halógenos; el mismo H_2O_2 o el radical perhidroxilo, como se ve a continuación.



Actualmente se cree que otras especies, de Fe (IV) o Fe (V) (como FeO^{3+} y complejos de ferrilo), son en realidad los agentes activos del proceso. En presencia de exceso de peróxido, la concentración de Fe^{2+} es pequeña con relación a la de Fe^{3+} , ya que la reacción (5) es más lenta que la (6). Ambos radicales, el $\bullet OH$ y el HO_2^\bullet reaccionan indiscriminadamente con la materia orgánica, pero el segundo es menos reactivo. La constante de velocidad para la reacción del ion ferroso con H_2O_2 es alta, y el Fe (II) se oxida a Fe (III) en segundos o minutos en exceso de H_2O_2 . Se cree por ello que la destrucción de residuos por el reactivo de Fenton es simplemente un proceso catalizado por Fe (III)- H_2O_2 , y que el reactivo de Fenton con exceso de H_2O_2 es esencialmente un proceso de Fe^{3+}/H_2O_2 . Por ello, estas reacciones ocurren también con iones metálicos de transición como el Fe (III) o el Cu (II), y se las conoce como reacciones tipo Fenton:



De acuerdo con Doménech *et al.*, [2001] en general el grado y la velocidad total de mineralización son independientes, del estado de oxidación inicial del Fe. Por su parte, la eficiencia y la velocidad inicial de mineralización son mayores cuando se parte de Fe (II); en contraste, las sales de Fe (III) producen una concentración estacionaria de Fe (II). Se debe usar aquí también un pH menor que 2.8.

4.3.3 FOTO-FENTON

Una manera de incrementar la eficiencia del proceso Fenton de oxidación es mediante su combinación con radiación UV, dando lugar al sistema denominado foto-Fenton. El uso de la radiación puede incrementar la eficiencia del proceso debido principalmente a la regeneración de iones ferroso y la producción extra de radicales hidroxilo durante la fotólisis de complejos férricos, según lo siguiente:



La utilización de radiación solar constituye una ventaja ya que disminuye significativamente los costos globales del tratamiento. En este sistema, se puede aprovechar el uso de longitudes de onda desde 300 nm hasta el visible.

Las concentraciones de Fe(II) que se requieren pueden ser hasta varios órdenes de magnitud menores que las necesarias en el sistema Fenton convencional.

El desempeño de estos sistemas depende principalmente del pH (idealmente debe estar entre 3 y 4, para evitar la precipitación de oxihidróxidos a pH alto, y la reducción de los radicales hidroxilo a pH muy ácido), temperatura (un incremento en la temperatura en principio es favorable, aunque puede acelerar la descomposición del peróxido de hidrógeno), y de las concentraciones de peróxido (se puede presentar un descenso en la eficiencia del proceso si se usa un exceso de peróxido) y del soluto a tratar.

Este método tiene sus ventajas, como ya se comentó, sin embargo, también tiene desventajas, entre ellas que requiere un suministro constante de peróxido y mantener condiciones ácidas, con el fin de evitar la precipitación de los hidróxidos de hierro. Sus principales aplicaciones se encuentran en el tratamiento de aguas industriales, suelos y lixiviados.

Sobre la aplicación que se ha dado al Foto-Fenton en el ámbito del tratamiento de agua para eliminar compuestos emergentes, se tienen las referencias de Elmolla and Chaudhuri [2009 en Homem & Santos, 2011] quienes estudiaron la degradación de amoxicilina, ampicilina y cloxacilina en concentraciones del orden de 100 mg/L en agua destilada, obteniendo, bajo condiciones óptimas, la completa degradación de los antibióticos en dos minutos. El trabajo de Rozas *et al.* [2010], referido en la revisión de Homem y Santos, sobre la oxidación de ampicilina (20 mg), que bajo condiciones óptimas (pH =3.5, 87 mM Fe²⁺, 454 mM H₂O₂) alcanzaron la degradación completa. Estos mismos autores alcanzaron una mineralización mayor (50% remoción de TOC) con el sistema foto-Fenton que con el Fenton convencional (20% remoción de TOC) obteniendo productos sin actividad antibacterial. En otro trabajo Bautitz y Nogueira

[2007] refieren el tratamiento de 24 mg/L de tetraciclina en tres matrices bajo irradiación solar y simulada, alcanzando la degradación total después de aproximadamente 1 min.

4.3.4 FOTOCATÁLISIS CON SEMICONDUCTOR

Las reacciones de oxidación degradativa requieren de tres componentes básicos:

- a) Una superficie catalítica foto-sensible, típicamente se usa TiO_2
- b) Una fuente de fotones
- c) Un agente susceptible de oxidación.

Fotocatálisis es el cambio en la velocidad de una reacción química, o su producción, bajo la acción de la luz en presencia de sustancias, denominadas fotocatalizadores, que absorben cuantos de luz y que están repetidamente involucrados en la transformación química de los participantes de la reacción, regenerando su composición química después de cada ciclo de tales interacciones [Parmon, 1997].

La irradiación de materiales semiconductores, como el TiO_2 o el ZnO , con luz de energía mayor o igual a la de la banda prohibida de energía, promueve un electrón, de la banda de valencia a la banda de conducción, dejando un hueco, en el lugar que ocupaba el electrón en la banda de valencia y un electrón adicional en la banda de conducción, conocido como par electrón-hueco, h^+/e^- (Fig. 4.1). Las especies fotogeneradas pueden recombinarse, quedar atrapadas en sitios de la red cristalina o bien migrar hacia la superficie del semiconductor, tal y como se esquematiza (Fig. 4.1). Una vez en la superficie pueden también ser atrapadas, recombinarse radiativa o no radiativamente o participar en reacciones redox. En este último sentido, el TiO_2 actúa como fotocatalizador [Serpone y Khairutdinov, 1996].

Estos dos mecanismos no se pueden diferenciar por el análisis de los productos de reacción, pues en ambos casos generan los mismos radicales orgánicos principales, como en el caso del fenol en que ambas rutas conducen al radical dihidroxiciclohexadienilo [Serpone y Khairutdinov, 1996]. Desde el punto de vista termodinámico, las propiedades redox del semiconductor tienen algunas limitaciones. Para que una especie pueda ser reducida, su potencial redox debe ser inferior al de la banda de conducción.

Son dos los modelos propuestos para explicar la fotooxidación de moléculas orgánicas en presencia de TiO_2 . El primero postula que los huecos fotogenerados de la banda de valencia reaccionan primeramente con agua fisisorbida sobre la superficie del TiO_2 , para dar lugar a radicales hidroxilo enlazados a la superficie (E° redox = 1.5 ± 0.3 V vs. electrodo normal de hidrógeno, ENH, a pH=0); reacción de oxidación, esquematizada en la parte inferior derecha de

la Fig. 4.1. Los radicales hidroxilo pueden reaccionar entonces con sustratos preadsorbidos o fotoadsorbidos, dándose así el primer paso en la oxidación de sustancias orgánicas. El segundo mecanismo propone la reacción directa entre los huecos de la banda de valencia ($E^\circ_{\text{redox}} = 3.0$ V vs. ENH a pH=0) y los sustratos orgánicos.

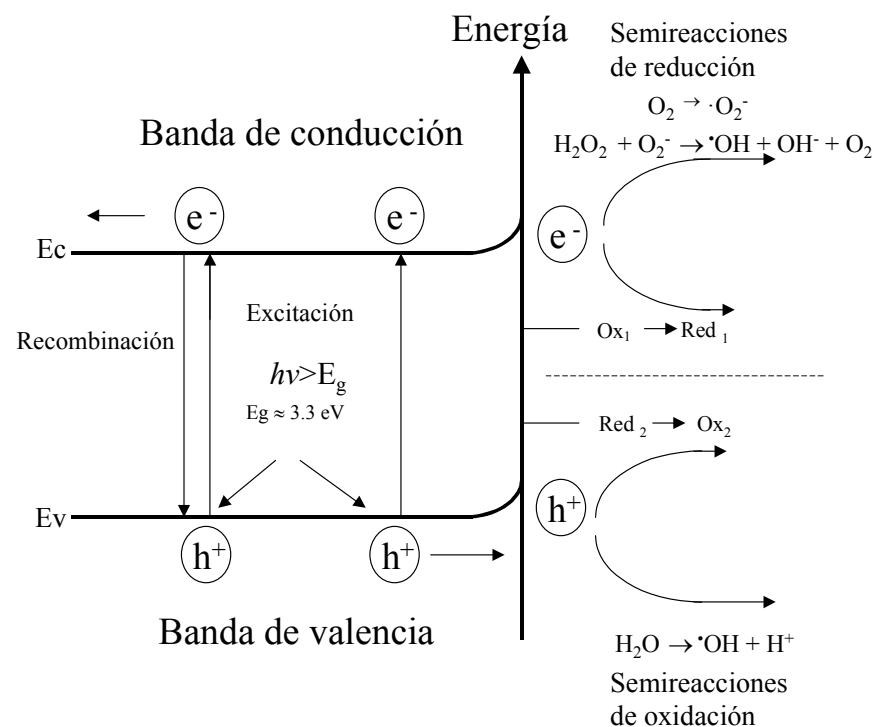
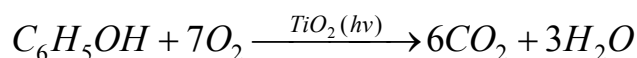


Fig. 4.1. Etapas iniciales en el proceso de descomposición fotocatalítica de sustancias orgánicas contaminantes, con dióxido de titanio

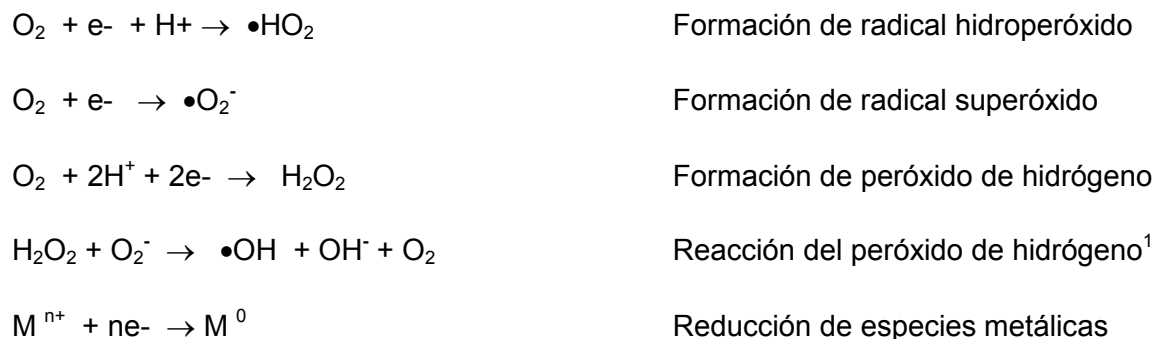
La oxidación de una especie es posible si su potencial redox se ubica por encima de la banda de valencia. Si el nivel redox de una especie está entre ambas bandas, los dos procesos, oxidación y reducción, pueden ocurrir.

El electrón puede reaccionar con especiesceptoras de electrones, como el oxígeno, evitando la recombinación y propiciando la posibilidad de reacción de los huecos con especies capaces de ceder electrones. Los huecos también pueden reaccionar directamente con moléculas orgánicas iniciando así su descomposición que puede terminar, en el mejor de los casos, en la oxidación total de estas moléculas, en donde los productos finales son CO_2 , agua y, en su caso, ácidos minerales diluidos, como se ejemplifica enseguida para el fenol:



Aunque los eventos químicos que ocurren en las partículas de semiconductor, y en la interfaz sólido-agua, son complejos, generalmente se acepta que ocurren tres categorías de reacciones [Blake *et al.*, 1991].

Reacciones productivas que convierten electrones y huecos en especies químicas activas:



Consumo de huecos:



Reacciones que transforman la materia orgánica en especies oxidadas

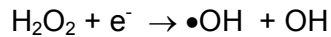


Reacciones que consumen radicales hidroxilo, no productivas

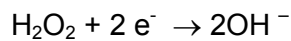
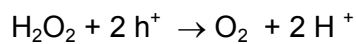


¹ Con formación de radicales hidroxilo

Mención aparte merece la adición de peróxido de hidrógeno pues, al igual que el oxígeno, es una especie oxidante capaz de recibir electrones, por lo que al hallarse en el medio puede generar también radicales hidroxilo.



Sin embargo, también puede consumir huecos y electrones (Ilisz et al., 1999), que constituyen reacciones parásitas que no contribuyen a la formación de radicales especies que, formalmente, promueven la degradación de los compuestos orgánicos.



En presencia de oxígeno (disolución aireada), adicionar este reactivo no mejoró significativamente la velocidad de reacción de oxidación del fenol. En general, en la literatura no hay acuerdo en cuanto a los beneficios que representa utilizar el peróxido de hidrógeno para mejorar la eficiencia en los procesos fotocatalizados con TiO_2 .

En términos de eficiencia de remoción, esta metodología parece ser prometedora para el tratamiento de efluentes con bajas cargas de materia orgánica; agua de ríos, agua subterránea y agua potable). A pesar de que la fotocatalisis con semiconductores ha sido estudiada por décadas y se han publicado innumerables artículos, esta tecnología no ha sido aplicada de manera práctica al tratamiento de agua debido a su bajo valor de energía eléctrica por orden [Homem y Santos, 2011].

4.4 PROCESOS DE ADSORCIÓN Y PROCESOS COMBINADOS

En cuanto a los procesos de adsorción, éstos no permiten la remoción efectiva de los contaminantes, sino sólo su transferencia a una nueva fase, en donde ahora están más concentrados. Los procesos combinados o integración de procesos, utilizan más de un procedimiento en una secuencia que permite maximizar el desempeño del tratamiento.

Zhang *et al.* [2006] estudiaron la combinación del proceso Fenton con osmosis inversa. Primero realizaron una extracción líquido-líquido para remover varios compuestos orgánicos. Posteriormente, realizaron la oxidación de Fenton y finalmente usaron un sistema de ósmosis inversa. La remoción global alcanzada para el TOC fue de 99%.

Por su parte, Sánchez-Polo *et al.* [2008], investigaron la aplicación simultánea de ozonación y adsorción en la remoción de imidazoles. Por su parte Ötker *et al.* [2005], también estudiaron la combinación de estas dos técnicas para la remoción de quinolonas. En este caso 80% del compuesto fue adsorbido y la ozonación degradó completamente el compuesto adsorbido en zeolita.

Otros ejemplos son la combinación de la fotocatalisis con semiconductor acoplada a nanofiltración. Se realizó la oxidación de lincomicina y la filtración permitió la separación de las partículas y de los productos de la degradación [Augugliaro *et al.*, 2005].

A pesar de que la combinación de métodos no es una práctica común, su aplicación es de las mejores opciones de que se dispone para abordar la eliminación de antibióticos en agua. Estos métodos no son utilizados de manera generalizada debido a su complejidad, altos costos de operación y la mayor parte de las veces debido a que no es práctico su uso en modo continuo.

Respecto a los métodos electroquímicos, en una revisión reciente realizada por Sirés y Brillas [2011]. Los autores clasifican estos métodos según se detalla en la siguiente sección.

4.4.1 TECNOLOGÍAS DE SEPARACIÓN ELECTROQUÍMICA

Se identifican dos procesos: tecnologías basadas en membranas y electrocoagulación.

El uso de membranas a presión provee una barrera efectiva para aislar la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos, así como microorganismos. La disposición de los concentrados representa cierto riesgo, por lo que algunos autores proponen el acoplamiento con Procesos Electroquímicos de oxidación avanzada.

La electrocoagulación emplea corriente eléctrica para disolver ánodos de hierro o aluminio inmersos en el agua contaminada. Su principal ventaja es su compatibilidad ambiental ya que su principal reactivo, el electrón, es un reactivo limpio. Este método ha sido visualizado como un pretratamiento para aguas residuales industriales, para acoplarlo a métodos biológicos.

4.4.2 TECNOLOGÍAS DE OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA

La electro-oxidación u oxidación anódica, involucra la oxidación de los contaminantes en una celda electrolítica sea por transferencia directa de electrones al ánodo, o por oxidación indirecta o mediada con especies oxidantes generadas en el ánodo tales como $\bullet\text{OH}$ fisisorbido u oxígeno activo quemisorbido. En el caso en que el agua contenga cloruros se generan especies activas

como cloro gas, ácido hipocloroso, hipocloritos y cloritos que pueden oxidar a los compuestos orgánicos presentes.

4.4.3 TECNOLOGÍAS ELECTROQUÍMICAS BASADAS EN LA QUÍMICA DEL REACTIVO DE FENTON

Esta alternativa electroquímica parece más atractiva ya que permite la electrogeneración continua y/o regeneración de los reactantes, es decir de H_2O_2 y Fe^{2+} , lo que incrementa la eficiencia del proceso y enfatiza su compatibilidad ambiental.

En una de las variantes del proceso anterior, el H_2O_2 es adicionado a la disolución. Se emplea una celda dividida para evitar que el OH^- generado en el ánodo disminuya la velocidad de la reacción de Fenton por efecto del incremento en el pH.

En el caso de la técnica Fotoelectro-Fenton, desarrollada por el grupo de Sirés y Brillas [2011], la disolución tratada bajo las condiciones de electro-Fenton es simultáneamente irradiada con luz UVA para acelerar la mineralización de los compuestos orgánicos, así, mediante la aplicación de la luz, se suman al sistema los beneficios del foto-Fenton.

4.4.4 FOTOELECTROCATÁLISIS

Consiste en la aplicación de un potencial anódico constante a un ánodo, generalmente basado en una película delgada de TiO_2 , irradiada con luz UV. Los electrodos fotoinducidos son extraídos continuamente del ánodo a través de un circuito externo para ser inyectados en el cátodo. De esta manera se incrementa el número de huecos disponibles para las reacciones de oxidación.

4.5 NUEVAS TENDENCIAS

Entre las alternativas innovadoras para la remoción o degradación de compuestos orgánicos emergentes del agua se encuentran los procesos avanzados de oxidación por plasma y nanomateriales tales como los nanotubos de carbono, los dendrímeros (polímeros de estructura dendrítica) y membranas nanoreactivas.

4.5.1 PLASMA NO TÉRMICO

Puede ser generado en la disolución contaminada o en el gas alrededor de descargas eléctricas generadas por: descarga corona, descargas de barrera dieléctrica, deslizamiento de arco, o contacto con descargas luminiscentes. La aplicación de esta opción, ha permitido la eliminación

de compuestos como el ácido clofíbrico, la carbamazepina y el iopromide, un medio de contraste.

Existen dos desafíos para la sustentabilidad de los tratamientos electroquímicos: obtener electrodos a menor precio y generalizar el uso de fuentes renovables de energía para suministrar a los procesos.

De manera general, las tecnologías de separación y oxidación electroquímica han sido poco documentadas para el tratamiento de contaminantes emergentes, por lo que se requiere más investigación y una mejor comprensión.

4.5.2 PROCESO AVANZADO DE OXIDACIÓN POR PLASMA

La empresa israelí Aquapure Technologies, patentó un proceso avanzado de oxidación mediante plasma no térmico para la degradación de compuestos orgánicos, especialmente los recalcitrantes. El sistema utiliza un electrodo de fibra de carbono y un electrodo de acero inoxidable a los que se les aplican pulsos de alto voltaje por lapsos de nanosegundos con frecuencias de 500 a 1,000 Hz. Los pulsos eléctricos de alto voltaje forman una corona de descarga que se origina en el electrodo de fibra de carbono y termina en la superficie del agua. Este campo energético provoca la ionización del aire dentro del reactor y la generación simultánea de ozono, radicales libres $\bullet\text{OH}$ y luz UV. En la Fig. 4.2 se muestra un esquema del reactor.

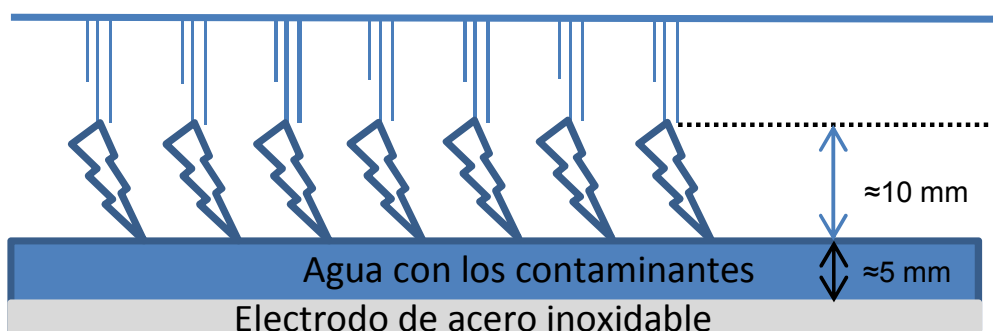


Fig. 4.2. Esquema de reactor de oxidación por plasma

Gerrety *et al.* [2009], probaron esta tecnología en experimentos a nivel laboratorio y semipiloto con recirculación y en un solo paso, las matrices empleadas fueron efluentes terciarios y superficial enriquecida; las sustancias a degradar fueron medicamentos (meprobamato, dilantin,

primidona, carbamazepina, atenolol, trimetoprima) y un plaguicida (atrazina). Observaron que hubo una degradación rápida de los compuestos analizados, incluso de meprobamato, primidona y atrazina que son los de carácter más recalcitrante. Una ventaja que resalta de la tecnología es que, a diferencia de otros PAOs (UV/H₂O₂ y O₃/H₂O₂), no requiere la adición externa de químicos ni la destrucción posterior del peróxido de hidrógeno.

En otro estudio, a escala piloto, Even-Ezra y su equipo [2009], evaluaron la eficiencia del proceso para la degradación de tricloroetileno (TCE), dimetilnitrosamina (DMNA) y 1,4-dioxano y compararon sus resultados contra los reportados por Carollo Engineers en una prueba piloto del PAO UV/H₂O₂. Los autores reportan que el índice de eficiencia energética (con unidades de KWh/m³) del proceso de plasma no térmico fue casi idéntico a la del UV/H₂O₂ para la degradación de TCE (1.65 y 1.58 KWh/m³ contra 1.7 KWh/m³), mientras que para DMNA el reactor de plasma fue más eficiente en todos los escenarios probados (0.87, 0.5 y 1.49 KWh/m³ contra 1.9 KWh/m³). En cuanto al otro compuesto estudiado no hubo forma de compararlo, pero se logró una remoción de 94% con un índice energético de 2.75 KWh/m³.

La tecnología de plasma no térmico tiene la capacidad para degradar los compuestos orgánicos incluso los recalcitrantes, sin embargo, la configuración del equipo no permite el tratamiento de grandes caudales.

4.5.3 NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono son macromoléculas de forma cilíndrica cuyas paredes están hechas de átomos de carbono entramados en forma hexagonal. Hay dos tipos principales de nanotubos de carbono, los de pared simple y los de paredes múltiples. Debido a que presentan una gran área superficial y a su estructura tubular son considerados como sorbentes potenciales. Theron *et al.* [2007] revisaron las evaluaciones de diversos autores que compararon el desempeño de los nanotubos de carbono contra carbón activado para la remoción de diversos compuestos y en todos los casos los nanotubos de carbono fueron más eficientes. En la Tabla 4.3 se muestran los datos reportados en el trabajo antes citado.

4.5.4 DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son macromoléculas ampliamente ramificadas, relativamente monodispersas, de composición y arquitectura controladas que constan de tres componentes: núcleo, celdas ramificadas interiores y celdas ramificadas terminales [Fréchet & Tomalia, 2001, Citados por Savage y Diallo, 2005].

Los dendrímeros tienen la capacidad para atrapar a los compuestos orgánicos ya sea por encapsulamiento o bien por adsorción electrostática en las ramificaciones de los dendrímeros; estos últimos pueden ser removidos por membranas de microfiltración o de ultrafiltración con un peso molecular de corte adecuado [Theron *et al.*, 2008].

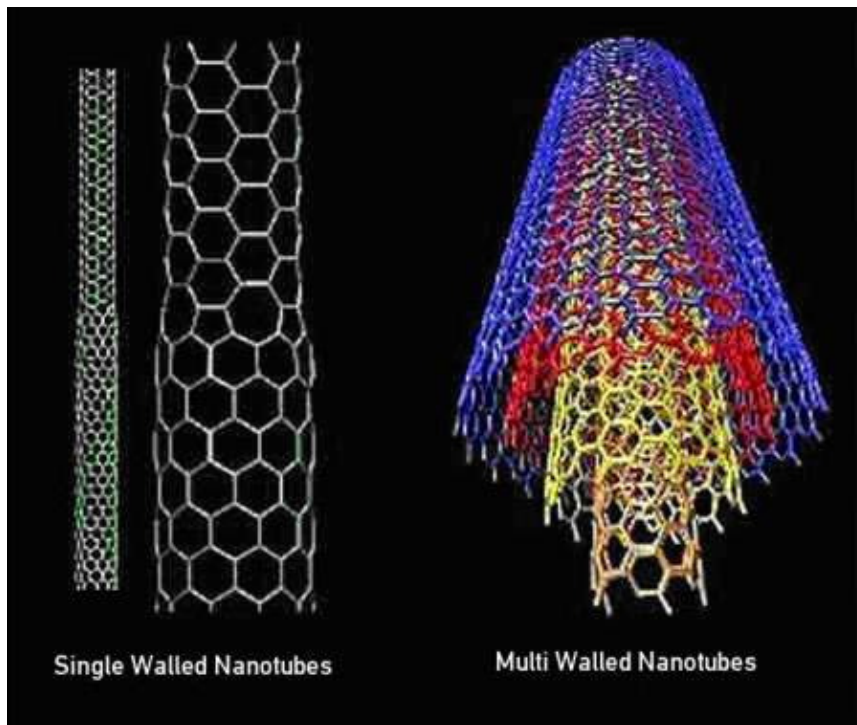


Fig. 4.3. Nanotubos de carbono de pared sencilla y de pared múltiple
Fuente: http://www.tedpella.com/gold_html/Nanotubes.htm

Tabla 4.4. Remoción de algunas sustancias orgánicas con nanotubos y carbón activado

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN INICIAL	TIPO		EFICIENCIA DE REMOCIÓN	
		Nanotubos de carbono	Carbón activado	Nanotubos de carbono	Carbón activado
P -nitrofenol	10 mg/L	Polimerizados	CAG	99	47
Tricloroetileno	10 mg/L	Polimerizados	CAG	≈100%	55%
Microcistinas	Nd	De pared sencilla	Base madera	4 veces mayor que para el carbón activado	

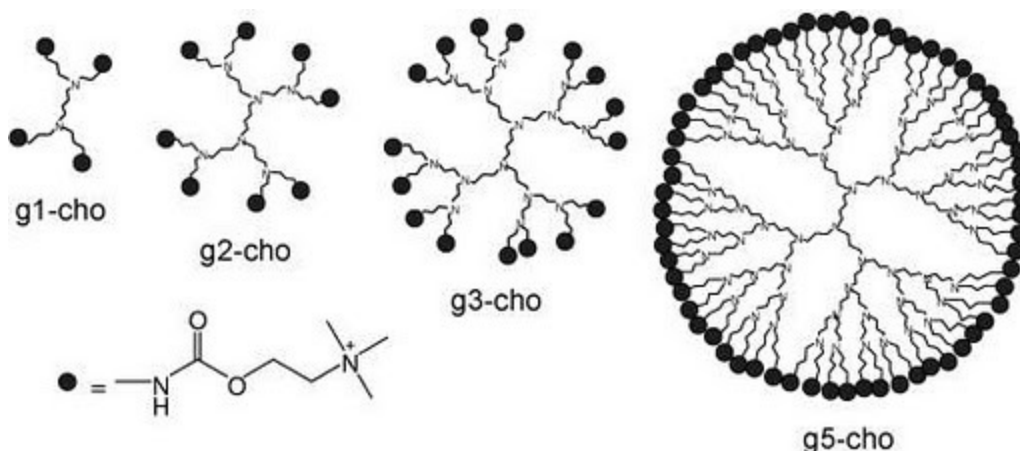


Fig. 4.4. Representación de dendrímeros

Fuente: <http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/2009/01/unir-para-destruir.html>

4.5.5 MEMBRANAS NANOREACTIVAS

En las revisiones del estado del arte de los nanomateriales efectuadas por Savage y Diallo [2005] y Theron *et al.* [2008], muestran membranas de distintos tipos acopladas con nanomateriales para lograr remoción de contaminantes específicos tanto orgánicos como inorgánicos. A continuación se enlistan tres ejemplos de los trabajos consignados en dichas revisiones:

DeFriend y colaboradores [2003], que elaboraron membranas de ultrafiltración acopladas con nanopartículas de alúmina con excelentes resultados en la remoción de algunas tintas y pigmentos. El segundo ejemplo es el desarrollo de membranas de acetato de celulosa impregnadas de nanopartículas de hierro de valencia cero, que Wu y colaboradores [2006] hicieron, para la deshalogenación reductiva de tricloroetileno. Los resultados alcanzados mediante este sistema mostraron que el sistema es muy efectivo.

El tercer trabajo es el de Dotzauer y colaboradores [2006], que lograron remover más del 99% de 4-nitrofenol y 4-aminofenol del agua utilizando membranas poliméricas modificadas con nanopartículas de oro.

Si bien, todos los ejemplos de membranas impregnadas o modificadas con nanomateriales son exitosos, ninguna de ellas está disponible comercialmente por lo que su aplicación en procesos de tratamiento a nivel municipal en este momento no es viable.

Por su parte, tanto los nanotubos de carbono como los dendrímeros si bien tienen propiedades que los hacen muy atractivos para el tratamiento del agua, esas mismas propiedades podrían

conferirles características tóxicas y es difícil evaluar el efecto que tienen sobre la salud humana y sobre el ambiente porque los métodos y herramientas para efectuar la evaluación no están totalmente desarrolladas [Theron *et al.*, 2008].

4.5.6 APLICACIÓN DE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES

A continuación en las Tabla 4.5 y Tabla 4.6, se listan algunos trabajos sobre la aplicación de procesos de oxidación avanzada aplicados específicamente a los contaminantes emergentes.

Tabla 4.5. Aplicaciones de los procesos de oxidación avanzada para la remoción de contaminantes emergentes

SUSTANCIA O COMPUESTO	REFERENCIA	TRATAMIENTO	DEGRADACIÓN (%)
Ibuprofeno y diclofenaco	Zwiener & Frimmel, 2000	Ozono con peróxido de hidrógeno (O ₃ /H ₂ O ₂).	90
Nonilfenol y bisfenol	Wintgens, <i>et al.</i> , 2002	Reactores biológicos de membranas y una unidad externa de ultrafiltración seguida de una absorción por medio de carbón activado granular	>90
Carbamazepina	Andreozzi <i>et al.</i> , 2002	Sistema combinado de fotocatalisis solar con TiO ₂ /H ₂ O ₂ y O ₃	100
α-Metilfenilglicina	Sirtori <i>et al.</i> , 2009	Foto-Fenton adicionado con H ₂ O ₂ como pretratamiento a un reactor de biomasa inmovilizada (IBR)	
Penicilina	Arslan <i>et al.</i> , 2004	Ozonación y perozonación (O ₃ +H ₂ O ₂)	83
Plaguicidas: metomil, dimetoato, oxamil, cimoxalin y pirimetanil	Oller <i>et al.</i> , 2007	Sistema de oxidación solar por fotocatalisis con TiO ₂ y foto-Fenton en reactores parabólicos	Cada plaguicida >90
4-clorofenol	Goel <i>et al.</i> , 2010	Fotocatalisis heterogénea utilizando dióxido de titanio, pretratamiento en un sistema biológico anaerobio de lodos activados	100

Tabla 4.6. Aplicación de procesos de oxidación avanzados para la remoción de fármacos

FÁRMACO	GRUPO/TIPO/USO	CONC. EN AGUAS MG/L	COND.EXPERIMENTALES	OBSERVACIONES	ELIMINACIÓN %	AÑO
Diclofenaco	Anti-inflamatorio	10(28.4)	<p>Escala laboratorio [C]₀=26µM (8 mg/L) Relación molar (O₃: diclofenaco) 10:1 Con/sin t-BuOH [O₃]₀ mínima para 10 µg/L de diclofenaco = 016mg/L.</p>	<p>K₀₃=6.8 x10⁵ M⁻¹ s⁻¹ (por reacción competitiva con butanol), propuesta de mecanismos de reacción del O₃ y HO• Subproductos: diclofenaco 2,5- iminoquinona (32%), 5-hidroxiciclofenaco (7%) 2,6-dicloroanilina (19%)</p>	<p>100 (degradación completa de los productos primarios potencialmente tóxicos)</p>	2008
Naproxeno	Anti-inflamatorio	0.33-0.39	<p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM , pH 7.8-8.7 [C]₀= 300 ng/L.</p> <hr/> <p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM [C]₀= 389 ng/L [H₂O₂] = 20 mM , 0.15 ml 30% w/v cada 5 min., en 5 L.</p>	<p>Aguas residuales caracterizadas y filtradas. 10 domésticas y 8 urbanas. Subproductos: oxalatos y carboxilatos de bajo peso molecular.</p>	<p>> 93 ≈ 15(TOC)</p> <hr/> <p>> 94 > 90 (TOC)</p>	2008
Metronidazol	Antibiótico, antibacteriano	0.2	<p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM , pH 7.8-8.7 [C]₀= 188 ng/l</p>	<p>Aguas residuales caracterizadas y filtradas. 10 domésticas y 8 urbanas.</p>	<p>91 ≈15 (TOC)</p>	2008

FÁRMACO	GRUPO/TIPO/USO	CONC. EN AGUAS MG/L	COND.EXPERIMENTALES	OBSERVACIONES	ELIMINACIÓN %	AÑO
			<p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM [C]₀= 212 ng/L [H₂O₂] = 20 mM , 0.15 ml 30% w/v cada 5 min, en 5L.</p>	<p>Subproductos: oxalatos y carboxilatos de bajo peso molecular.</p>	<p>92 >90 (TOC)</p>	
Sulfametoxazol	Antibiótico, sulfonamida	0.12-0.15	<p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM , pH 7.8-8.7 [C]₀= 117 ng/L</p> <p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM [C]₀= 150 ng/L [H₂O₂] = 20 mM , 0.15 ml 30% w/v cada 5 min, en 5L.</p>	<p>Aguas residuales caracterizadas y filtradas. 10 domésticas y 8 urbanas. Subproductos: oxalatos y carboxilatos de bajo peso molecular.</p>	<p>87 ≈ 15(TOC) 90 >90 (TOC)</p>	2008
Ofloxacida	Antibiótico, fluoroquinolonas	0.46-0.56	<p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM , pH 7.8-8.7 [C]₀= 464 ng/L</p> <p>Escala de laboratorio [O₃]= 0.23 mM [C]₀= 565 ng/L [H₂O₂] = 20 mM , 0.15 ml 30% w/v cada 5 min., en 5L</p>	<p>Aguas residuales caracterizadas y filtradas. 10 domésticas y 8 urbanas. Subproductos: oxalatos y carboxilatos de bajo peso molecular.</p>	<p>>93 ≈ 15(TOC) >94 >90(TOC)</p>	2008

La revisión de la bibliografía publicada en los últimos diez años, realizada por Homem y Santos [2011] presenta una excelente recopilación sobre el tratamiento aplicado tanto a muestras sintéticas como reales conteniendo diversos antibióticos. La información se encuentra resumida en cuadros del tipo antes presentados, por lo que se recomienda consultarlos al lector interesado.

Las tablas anteriores permiten visualizar el tipo de condiciones en que se realizan los experimentos para la remoción de contaminantes emergentes utilizando los diversos procesos de oxidación avanzada. Como parte de este estudio se abordó experimentalmente la oxidación fotocatalítica de carbamazepina, por lo que se sintetizan algunos trabajos sobre la remoción de carbamazepina en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Síntesis de los principales trabajos dirigidos a la remoción de carbamazepina en agua

CONCENTRACIÓN EN AGUA	CONDICIONES EXPERIMENTALES	OBSERVACIONES	ELIMINACIÓN (%)	AÑO
	Relación molar (O ₃ :carbamazepina)=10; [C] ₀ =0.8-118mg/L; [O ₃] ₀ = 1.0 mg/L; 10-60 min.	Aguas naturales. Bajo grado de mineralización después de 60 min. K ₀₃ =(7.81+/- 1.31)*10 ⁴ M ⁻¹ S ⁻¹	100	2002
0.08 mg/L	Escala de laboratorio [C] ₀ = 1 µg/L; [O ₃] = 0.5 mg/L;	KO ₃ >10 ⁵ M ⁻¹ S ⁻¹ Simulación de una estación depuradora Real: Pre-ozonización [O ₃]= 0.7-1.0 mg/L durante 3 min. Floculación (FeCl ₃). Filtración (GAC). Ozonización principal [O ₃]= 1.0-1.5 mg/L durante 10 min. Filtración multicapa, y adsorción final con GAC	100	2002
	[C] ₀ = 7.1 mg/L; [O ₃] = 0.42 mM pH 7.6; 298 °K; 1.2 y 5 min.	Agua sintética Medidas de toxicidad (Rotokit) con algas y con rotíferos. Sin generación de productos tóxicos	100 (en 2 min.)	2004
	Escala de laboratorio [C] ₀ = 0.5 µM [O ₃] = 0.1-2 mg/L [t-BuOH]= 10-50 mM pH 7-8; (buffer fosfato 5-50 mM): 10-20° C ; 10 min.	4 aguas naturales con distinto DOC (1.2-3.7 mg/L) Alcalinidad (0.7-4.1 mM) K ₀₃ = 3x10 ⁵ M ⁻¹ S ⁻¹ K _{OH} = 3.3-9.8*10 ⁹ M ⁻¹ S ⁻¹	97-99	2003

CONCENTRACIÓN EN AGUA	CONDICIONES EXPERIMENTALES	OBSERVACIONES	ELIMINACIÓN (%)	AÑO
2.1 +/- 0.04 mg/L	Planta piloto (2m ³ /h) [C] ₀ = 2.1 µg/L; [O ₃] = 5-15 mg/L pH 7.2 : 18 min.	[DOC] ₀ = 23.0 mg/L; DQO = 30.0 mg/L; DBO ₅ = 2.8 mg/L; Desinfección de microorganismos (<i>Clostridium</i> , streptococos, <i>Escherichia coli</i>). Evaluación económica	>98	2003
0.065 mg/L	Escala de laboratorio [O ₃] = 0.23 mM; pH 7.8-8.7 [C] ₀ = 65 ng/L	Aguas residuales caracterizadas y filtradas: 10 domésticas y 8 urbanas Subproductos: oxalatos y carboxilatos de bajo peso molecular.	>94 ≈15(TOC)	2008
	Escala de Laboratorio [O ₃] = 0.23 mM; pH 7.8-8.7 [C] ₀ = 61 ng/L [H ₂ O ₂] = 20 mM , 0.15ml (30% w/v) cada 5 min. en 5L		>98 >90(TOC)	

4.6 APLICACIÓN PRÁCTICA DE LA FOTOCATÁLISIS. EL CASO DE LA CARBAMAZEPINA

Del análisis de la información revisada es claro que cada metodología ofrece ventajas y desventajas y que las más utilizadas son la ozonación, Fenton, foto-Fenton y fotocatalisis heterogénea con TiO₂.

En este estudio se seleccionó a la fotocatalisis heterogénea con TiO₂ como la metodología a evaluar experimentalmente para determinar en qué medida puede ser útil para el tratamiento de un agua subterránea específica. Para ello se utilizó a la carbamazepina como compuesto modelo y se prepararon disoluciones en agua deionizada como matriz.

4.6.1 ANTECEDENTES

De entre los muchos contaminantes clasificados como emergentes, se seleccionó a la carbamazepina como una molécula representativa para evaluar el tratamiento por fotocatalisis heterogénea con TiO₂ inmovilizado.

Como se detalla líneas abajo, es un compuesto encontrado frecuentemente en cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos.

Leclercq *et al.* [2008] demostraron que entre los fármacos más habitualmente hallados en ambientes acuáticos está la carbamazepina. Asimismo, estos investigadores mencionaron que este compuesto activo se encuentra disperso generalmente en aguas residuales y superficiales y, pese a que es difícil su remoción mediante métodos convencionales para el tratamiento de

aguas, el tratamiento de aguas residuales con un tiempo de retención hidráulico de 78 días, puede disminuir la concentración de carbamazepina, hasta en un 73%.

Herber *et al.* [2002], realizaron estudios de monitoreo de compuestos fármacos en los años 1996 y 1999 en agua subterránea, en donde identificaron a los fármacos: diclofenaco, ácido clofíbrico, ibuprofeno, propípezona, primidona y carbamazepina a bajas concentraciones, pero en el caso de algunos compuestos ellos determinaron concentraciones de hasta 7.3 µg/L. Y mencionaron que la velocidad de remoción de la Carbamazepina tanto en influentes como en efluentes fue relativamente baja (8 %).

Fenz *et al.* [2005], reportaron que el antiepiléptico carbamazepina se encontró en el efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales en concentraciones superiores a 3.8 µg/L. Las plantas que usan el sistema de lodos activados, remueven muy pocas cantidades del fármaco carbamazepina. Pero existen estudios donde indican un incremento en la concentración de este compuesto durante el tratamiento del agua debido a los conjugados metabólicos que se forman durante estos procesos. Por tal razón al descargar el agua residual a los ríos o a un cuerpo receptor hay residuos de este antiepiléptico.

Asimismo, Loeffler *et al.* [2005], estudiaron la adsorción de carbamazepina en el tratamiento de lodos activados evaluando el comportamiento de adsorción del fármaco en sistemas agua/sedimento. Los autores mostraron que el antiepiléptico CBZ tiene una moderada afinidad por la sedimentación, argumentando que se debe a su lipofobicidad. Pero de forma global concluyeron que la adsorción de CBZ en el sistema de lodos activados fue mínima.

Por otra parte, se ha reportado que la CBZ tiene una gran resistencia a la degradación y determinaron su presencia en efluentes tratados de aguas residuales municipales así como en aguas superficiales. Estos autores indicaron que en contraste con el tratamiento clásico de aguas residuales municipales donde persiste este fármaco, la CBZ puede removerse en un alto porcentaje mediante los procesos avanzados de oxidación química (PAOs), tales como ozonación y degradación fotocatalítica con TiO₂. La fotodegradación puede contribuir a la remoción de carbamazepina y otras moléculas, lo cual conduce a la degradación de compuestos más biodegradables. Leclercq *et al.* [2009], mostraron que la fotólisis directa conduce a la formación de acridina y acridona. Estos compuestos también se forman durante el proceso de fotocatalisis heterogénea, tienen alta toxicidad pero también logran ser oxidados en este último proceso.

Stamatelatou *et al.* [2003], Mcdowell *et al.* [2005], Hua *et al.* [2006], Carballa *et al.* [2007] y Kotcharaksa [2008], evaluaron diferentes procesos para la remoción del antiepiléptico, entre los que se encuentran: procesos biológicos, químicos, fotodegradación y adsorción.

El proceso biológico desarrollado por Stamatelatos *et al.* [2003], consistió en utilizar un reactor tipo Batch SBR (sequencing batch reactor) operado durante un tiempo de residencia hidráulico de 10 días para la degradación de la CBZ. Los autores concluyeron que el fármaco no fue degradado en el SBR, por lo que decidieron efectuar dos estudios uno a nivel laboratorio y otro a gran escala en un sistema de lodos activados para disminuir la. En el experimento a nivel laboratorio determinaron una insignificante velocidad de remoción de CBZ, en tanto que en el sistema de lodos activados efectuado a gran escala, demostraron pequeñas reducciones de concentración, de menos de 30% del compuesto.

En otro reporte, Carballa *et al.* [2007], procesaron muestras de agua que contenían CBZ. Los autores realizaron sus experimentos a nivel piloto y en campo. Usando digestión anaerobia, encontrando muy poca remoción de CBZ. Sólo un procedimiento biológico donde emplearon biorreactores con membranas, suplementados con carbón activado, reflejó biodegradación de carbamazepina de entre 30 y 40%.

Por otra parte, los procesos químicos que usaron Ternes *et al.* [2002], para el tratamiento de aguas con residuos de carbamazepina fueron oxidación avanzada principalmente con ozono y fotocatalisis. Determinaron que la oxidación avanzada con dosis 0.5 mg/L de este reactivo, removi6 el 90% de CBZ que se encontraba en el agua. Complementando lo anterior, las investigaciones de McDowell *et al.* [2005] y Hua *et al.* [2006], hacen referencia a que el ozono reacciona con el doble enlace del grupo carbonilo formando subproductos que consisten principalmente en grupos quinol que son más fácilmente degradables que la molécula de CBZ de la cual proceden.

Estudios realizados por Prairie *et al.* [1993], Hoffmann *et al.* [1995], Bahnemann [1999] y Malato *et al.* [2002], mencionan que el proceso de oxidación avanzada empleando fotocatalisis en combinación con el catalizador TiO_2 , fue eficaz para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos emergentes, primordialmente CBZ. Los autores destacan que este proceso utiliza la radiación UV e indicaron que la radiación UV por si sola en la degradación de CBZ no fue eficiente. Asimismo, resaltaron, que la luz UV en conjunto con el catalizador TiO_2 incrementó substancialmente la eficiencia de remoción de carbamazepina obteniendo hasta un 99%.

En la Fig. 4.5 se muestra la ruta de degradación de carbamazepina mediante el proceso de fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio [Doll y Frimmel, 2004].

Considerando estos antecedentes y la necesidad de un tratamiento efectivo para eliminar compuestos emergentes de los rechazos o salmueras generadas en los tratamientos de potabilización del agua mediante procesos de membrana, se concluye que es necesario evaluar

nuevas técnicas para remover completamente estos residuos y evitar así que fármacos y otros productos emergentes se propague en fuentes naturales de abastecimiento.

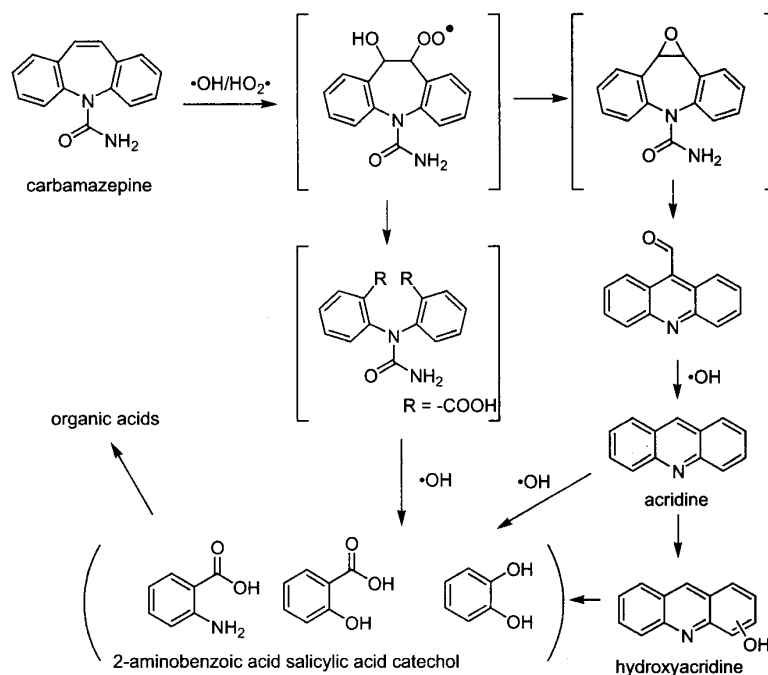


Fig. 4.5. Vías de degradación de carbamazepina mediante Fotocatálisis con TiO_2

4.6.2 METODOLOGÍA

En este caso se decidió evaluar la fotocatalisis con TiO_2 , una efectiva modalidad de los métodos de oxidación química avanzada. Se evaluó una forma de dióxido de titanio inmovilizada sobre vidrio Pyrex mediante la técnica de sol-gel, que la hace una forma muy estable del catalizador y que facilita su aplicación ya que no se requiere ningún proceso adicional para separar el catalizador, como normalmente sucede cuando se utiliza en polvo.

4.6.2.1 Materiales y reactivos

- Carbamazepina (CBZ) grado estándar de la marca Sigma-Aldrich
- Acetona, nanogrado
- Agua deionizada
- Kit comercial para determinación de CBZ, marca Abraxis

4.6.2.2 Concentrador autónomo para la degradación de carbamazepina en agua

La experimentación se realizó en un reactor tipo CPC (Fig. 4.6), diseñado por Manuel Collares Pereira de acuerdo a las características del proyecto SOLAR SAFE WATER [Collares, 2005]. El reactor es un sistema estático, que se compone de cuatro tubos o reactores internos de vidrio de borosilicato, los cuales se alinean con el eje este-oeste, sobre un plano inclinado a tantos grados como la latitud del lugar, logrando la orientación óptima del reactor. Si el reactor tiene otra orientación, el sistema pierde eficiencia dado que recibe menos horas de radiación. Es importante tener en cuenta las sombras que caen sobre el reactor, ya que una sombra mal calculada puede hacer que el reactor detenga su proceso. Por ello, el equipo se debe colocar en una superficie donde no se proyecte ninguna sombra para que la radiación sea siempre constante, ya que la interrupción no controlada de la radiación es un problema importante en las operaciones del reactor.

No todos los vidrios transmiten la radiación UV. Los vidrios comunes tienen un contenido de hierro que absorbe la radiación UV, de manera que es necesario utilizar vidrio sin hierro o con bajo contenido del mismo para evitar pérdida de absorción. En el reactor se utilizan tubos de vidrio borosilicato [Collares, 2005] de 1.8 mm de espesor, 0.045 m de diámetro interno y 0.94 m de longitud de marca SCHOTT Durán. Las conexiones que unen a los tubos de vidrio, al contenedor y a la bomba, están hechas de plástico resistente a radiación UV. El equipo autónomo cuenta con un celda fotovoltaica de 0.33 m² para el funcionamiento de la bomba la cual tiene una capacidad de 0.2 L/s.

El reactor cuenta con una superficie total de colección de 0.61 m². Para obtener la mayor captación de radiación solar el reactor tiene un ángulo de incidencia, que se logra empleando el ángulo correspondiente a la latitud geográfica [Chacón, 2003]. Para la ciudad de Cuernavaca, los colectores están colocados en forma horizontal sobre una plataforma con una inclinación de 19° equivalente a la latitud local, con respecto a la horizontal, para evitar ajustes por el ángulo de inclinación del colector.

Dentro del reactor se coloca una forma inmovilizada del catalizador dióxido de titanio, preparada mediante la técnica de sol-gel [Gelover 2004], consistente en películas del catalizador soportadas sobre vidrio Pyrex®, lo que permite manejar el catalizador de una manera muy limpia, ya que al encontrarse inmovilizado no requiere ningún proceso de recuperación del catalizador como sería filtración por 0.45 µm o centrifugación, en el caso de utilizarse el catalizador en su forma tradicional, en polvo (Fig. 4.7).

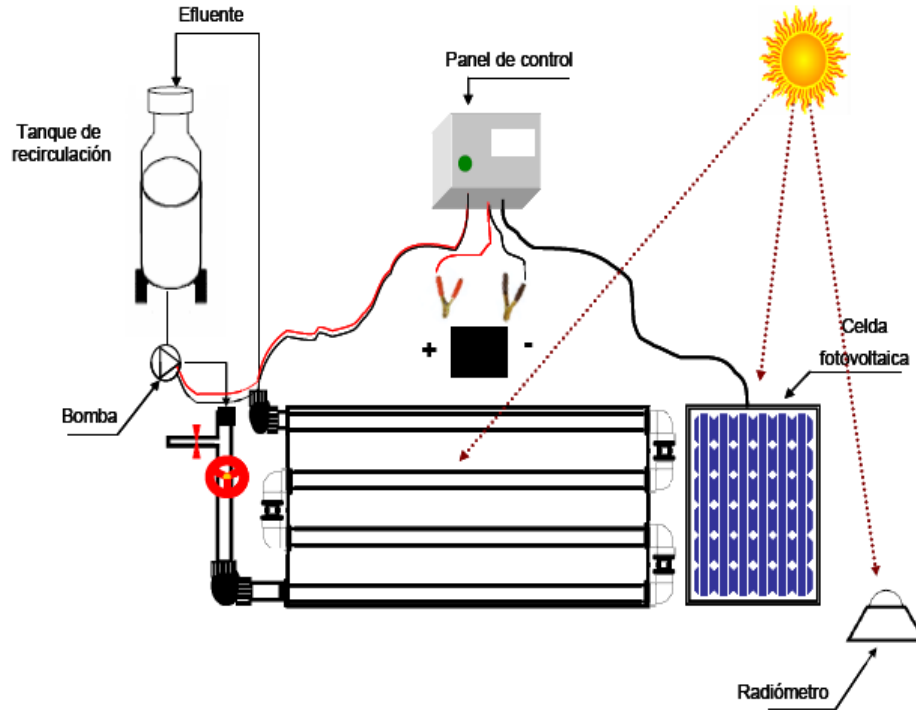


Fig. 4.6. Esquema del equipo utilizado para las prueba de tratabilidad

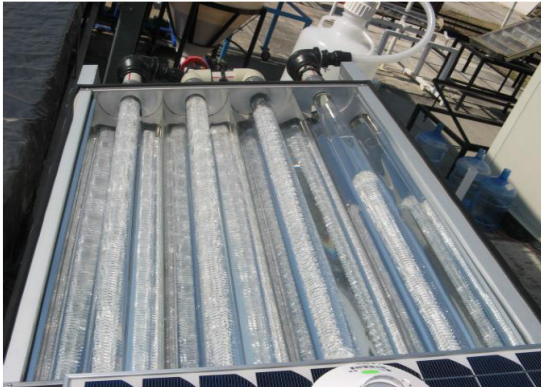


Fig. 4.7. Fotografías de los fotorreactores (izq.) y detalle del catalizador inmovilizado sobre vidrios Pyrex (der.) en un arreglo sobre una varilla de vidrio a manera de soporte

4.6.2.3 Cuantificación de carbamazepina

Para evaluar la efectividad del proceso de tratamiento seleccionado, la carbamazepina se determinó mediante inmunoensayo enzimático, esto es una prueba de ELISA con el kit Abrxis. Se basa en la detección de un antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac), inmovilizado sobre una fase sólida y mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima cuyo producto colorido, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene las propiedades del inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre [Pérez y Sevilla, 2009].

Consideraciones generales de la técnica

Las condiciones de almacenamiento de este Kit son en un refrigerador con una temperatura de 4-8 °C y antes de ser usado es conveniente dejarlo un tiempo a temperatura de 20-25°C para garantizar la reproducibilidad de las determinaciones.

Las fases para la realización de una técnica de ELISA se listan a continuación [Pérez y Sevilla 2009]:

- a) Sensibilización de la placa
- b) Bloqueo de espacios vacíos.
- c) El Ag o Ac se fija a una superficie
- d) Aplicación del espécimen de prueba
- e) Controles positivo y negativo
- f) Detección y caracterización por Ac. Marcado
- g) Incubación con la muestra
- h) Incubación con el sistema de detección
- i) Adición del sustrato

De acuerdo con el fabricante, el límite de detección de la prueba es de 0.021 ppb ($\mu\text{g/L}$).

Reproducibilidad: el coeficiente de variación (CVs) esperado para los estándares es de <13% y para el caso de muestras es de <20%.

Selectividad: la técnica exhibe una excelente reactividad con el fármaco y no presenta reacción con compuestos que no sean derivados de carbamazepina.

Reactividad:

- Carbamazepina (CBZ) 100%
- 10,11-Dihidro CBZ 97%
- 10,11-Epoxi CBZ 78%
- 2, Hidroxi CBZ 13%
- Protriptileno 8.6%
- Amitriptileno 4.1%
- Opipramol 3.9%
- Imipramina 3.6%

El kit ofrece características suficientes para ser empleado en la determinación del fármaco durante los experimentos de oxidación fotocatalítica planeados.

- a) Materiales del Kit Abraxis Carbamazepina:
- b) Plato (microtiter) cubierto con un segundo anticuerpo
- c) Estándares (0,0.025, 0.050, 0.10, 0.25, 0.5, 2.5 ng/mL)
- d) Solución de anticuerpo (mouse anti-carbamazepina), 6 mL
- e) Carbamazepina-HRP, 6mL
- f) Diluyente/cero, 25 mL
- g) Se usa para diluir muestras con una concentración superior a 2.5 ppb
- h) Solución de lavado concentrada 5X (100 mL)
- i) Solución de color (TMB), 12 mL
- j) Disolución de paro, 6 mL

Procedimiento de la Técnica ELISA (Abraxis) para la determinación de Carbamazepina

- a) Agregar 50 µl de la disolución diluyente, a los pocillos a utilizar. (Se usa esta disolución para diluir muestras con una concentración arriba de 2.5 ppb)

- b) Adicionar 75 µl de la solución estándar, control y muestras, cada uno en dos pocillos del plato (microtiter), se recomienda que se usen duplicados o triplicados para la corroboración de resultados. Se sugiere seguir la secuencia mostrada en la Tabla 4.8.

Donde:

- C: Representa el control o el estándar 0
S1-S6: Son los estándares 1 al 6 respectivamente
E1-E6: Es la muestra problema a cuantificar
B: Indica el blanco, en este caso es agua deionizada

Tabla 4.8. Configuración de los controles, estándares y muestras en el Microtiter

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C	E-2	E-2				B				
B	S1	S1	E-3	E-3				B				
C	S2	S2	E-4	E-4				B				
D	S3	S3	E-5	E-5				B				
E	S4	S4	E-6	E-6				B				
F	S5	S5						B				
G	S6	S6						B				
H	E-1	E-1						B				

- c) Adicionar 50 µl de la disolución de enzima conjugada a todos los pocillos
d) Colocar 50 µl de la solución de anticuerpo a todos los pocillos, tapar con parafilm y mezclar el contenido de forma circular aproximadamente 30 segundos, y dejar incubar 90 minutos a una temperatura de 4-8°C
e) Transcurrido el tiempo, vaciar los pocillos de un solo golpe y lavar 4 veces con la solución buffer 1X. Sacudir la placa con leves golpecitos en un papel
f) Añadir 100 µl de la solución de color a todos los pocillos, tapar con parafilm, agitar suavemente por 30 segundos e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Cubrir las muestras de la luz del sol
g) Añadir 50 µl de la solución de frenado a todos los pocillos en la misma secuencia en que se adicionó la disolución substrato/color
h) Por último, leer la absorbancia usando un lector de placas de ELISA a 450 nm, 15 minutos después de finalizada la reacción

Curva de calibración

Para la extrapolación de los resultados obtenidos en los experimentos de degradación de carbamazepina mediante Fotocatálisis Heterogénea con dióxido de titanio (FH/TiO₂) a diferentes tiempos, se realizó una curva de calibración utilizando los estándares incluidos en el Kit Abraxis, cuyas concentraciones en nanogramos fueron: 25, 50, 100, 250, 500 y 2,500 ng/, se incluyó un control sin fármaco y se muestreó periódicamente (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Concentraciones de carbamazepina estudiadas por fotocatalisis heterogénea

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (NG/L)	TIEMPO TOTAL DE EXPOSICIÓN (H)	PERIODICIDAD EN EL MUESTREO (MIN)
1	2500	1	10
2	1000	1	10
3	500	1	10
4	500	3	30, 60
5	150	3	30, 60

En la Fig. 4.8 se muestra una típica curva de calibración obtenida. En las abscisas se grafican los valores para el Log₁₀ de las concentraciones de los estándares y en la ordenada los valores correspondientes del %B/Bo, que corresponden al cociente de las absorbancias relativas de cada estándar respecto del estándar de concentración cero o blanco. Se observa que, la relación de la concentración vs % B/Bo es inversa, lo que significa que el color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración.

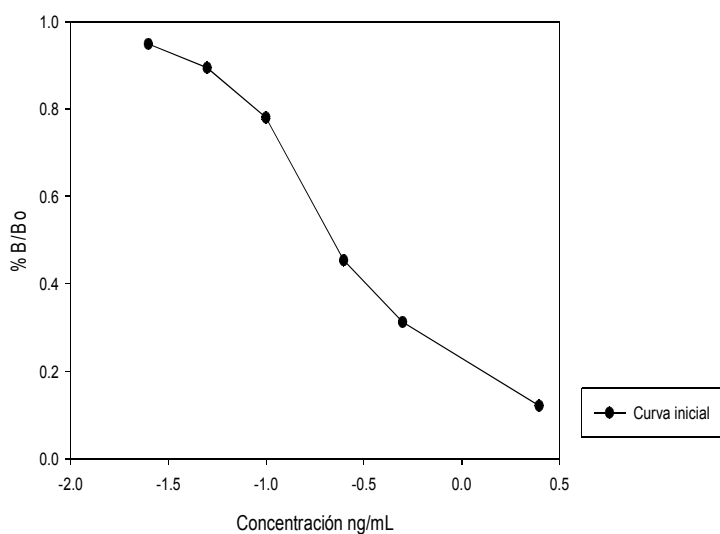


Fig. 4.8. Curva de calibración para la cuantificación de carbamazepina en agua

4.6.2.4 Muestra sintética de fármacos para tratamiento fotocatalítico.

Con el fin de obtener una estimación de la efectividad del proceso de oxidación fotocatalítica heterogénea, en el tratamiento de salmueras generadas por el proceso de potabilización con membranas de agua subterránea contaminada con algunos fármacos (Cortés, *et al.*, 2011) se preparó una muestra sintética con agua desionizada y fármacos comerciales.

A la muestra sintética se incorporaron los fármacos que fueron detectados en muestras de agua subterránea. Para preparar la disolución, primero se generó una disolución madre conteniendo los fármacos en concentraciones del orden de mg/L.

Para preparar esta disolución se tomaron en cuenta las solubilidades de todos los fármacos utilizados, por lo que se utilizó como disolvente etanol, que disuelve a todos los fármacos empleados en la disolución. A partir de esta disolución se generaron diluciones en agua hasta alcanzar concentraciones del orden de nanogramos por litro. La disolución final se expuso durante tres horas a radiación solar, en el concentrador autónomo descrito.

Los fármacos utilizados para preparar la muestra sintética fueron: Metilprednisolona, DEET, cafeína, eritromicina-H₂O, sulfametoxazol y carbamazepina (Tabla 4.10). Esta última se trabajó a una alta concentración, pues era del orden de concentración que se estaba trabajando en ese momento en las pruebas de fotocátalisis. En todos los demás casos las concentraciones se aproximaron a los valores encontrados en el agua subterránea.

Tabla 4.10. Concentraciones de los solutos con los que se preparó la muestra sintética

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN EN EL ACUÍFERO (NG/L)	CONCENTRACIÓN EN LA MUESTRA SINTÉTICA (NG/L)
Eritrocina	1.35	1.35
Sulfametoxazol	10.4	22.8
Cafeína	24.3	24.3
Metilprednisolona	12.9	12.9
DEET	0.923	2.5
Carbamazepina	5.24	1,500

Muestras tomadas a la entrada y salida del tratamiento fueron enviadas a AXYS Analytical Laboratories, en British Columbia, Canadá, para su análisis

De acuerdo con el procedimiento del laboratorio, las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción en medio ácido (pH=2) y analizadas mediante un sistema acoplado de cromatografía de líquidos- espectrometría de masas, en modo *Positive Electrospray Ionization* LC-MS-MS. Los controles de calidad para el análisis de los fármacos incluyen el análisis de un blanco, el uso de

surrogados, o sustitutos, isotópicamente marcados para determinar los porcentajes de recuperación, muestras fortificadas, así como el uso de estándares internos para realizar la cuantificación.

4.6.3 RESULTADOS

En esta sección se presentan resultados de la evaluación experimental de la oxidación fotocatalítica de carbamazepina utilizando dióxido de titanio inmovilizado y energía solar como catalizador, así como los resultados obtenidos para la muestra sintética, una mezcla de seis fármacos, después de tres horas de exposición en el sistema de oxidación fotocatalítica.

4.6.3.1 Estudio de la oxidación fotocatalítica de carbamazepina

Cuando Estudio de la oxidación fotocatalítica de carbamazepina se realiza este tipo de estudios, es conveniente verificar inicialmente que la molécula de estudio no sufra cambios en su concentración, por otros efectos que no sean los atribuibles a la actuación del catalizador activado por la energía, en este caso del sol.

En estas pruebas se realizaron dos controles: el primero para verificar que el sistema de recirculación no destruyera la molécula, esto es necesario ya que en ocasiones el bombeo, la adsorción sobre los materiales del sistema, entre otros efectos modifican la concentración del soluto en estudio. El segundo control se realizó para determinar la proporción que juega la fotólisis en la transformación de la molécula dentro del sistema fotocatalítico.

Para llevar a cabo el estudio de la degradación del fármaco carbamazepina se utilizaron 300 g de anillos de TiO_2 inmovilizado (equivalente a 525 mg de TiO_2) distribuidos en los cuatro reactores del equipo. Los anillos están sujetos con hilo para evitar que sean arrastrados por la corriente dentro de los reactores.

4.6.3.2 Efecto de la recirculación y de la fotólisis

Las Fig. 4.9 y

Fig. 4.10, ilustran los resultados obtenidos, para la modificación de la concentración de CBZ por recirculación de la muestra en condiciones de no iluminación y para el caso de la recirculación en el sistema en ausencia del catalizador.

En la se pueden observar los valores de tiempo de residencia, pH, temperatura, radiación y energía acumulada asociados a las muestras tomadas (cada 10 minutos) durante la exposición de la muestra de 2500 ng/L a la radiación solar.

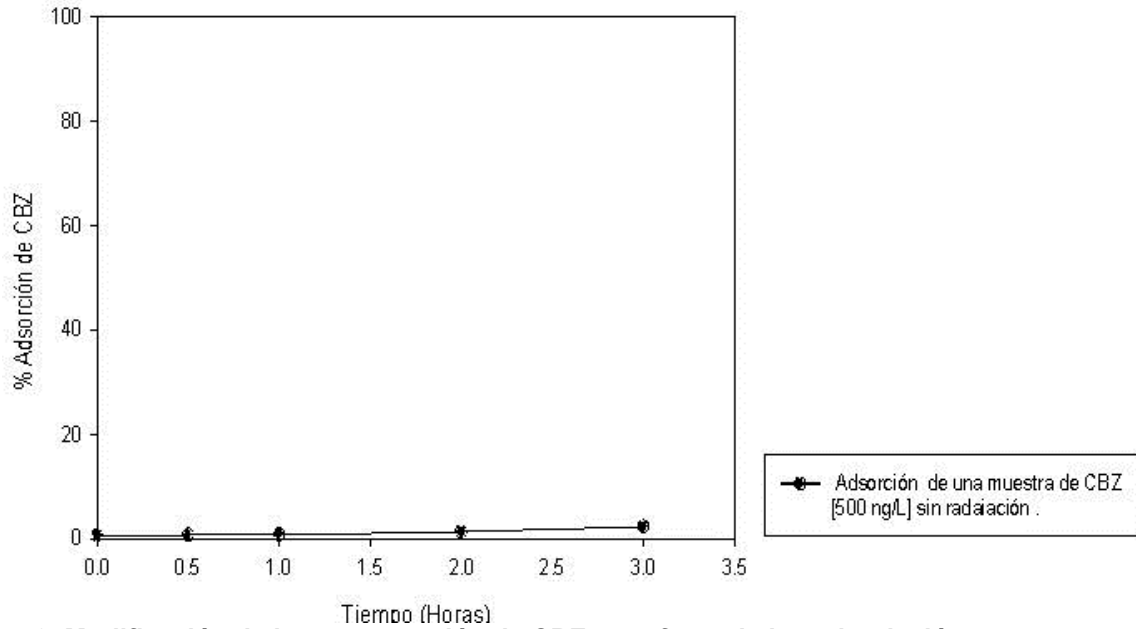


Fig. 4.9. Modificación de la concentración de CBZ por efecto de la recirculación

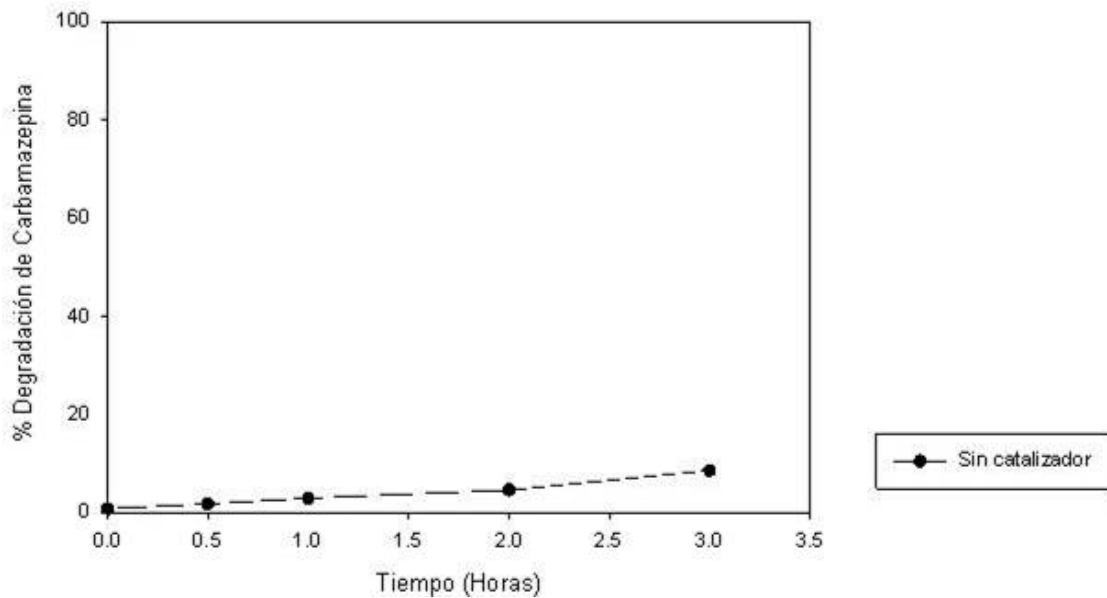


Fig. 4.10. Resultados de la prueba para determinar el efecto de la fotólisis sobre CBZ

En la Tabla 4.11 se pueden observar los valores de tiempo de residencia, pH, temperatura, radiación y energía acumulada asociados a las muestras tomadas (cada 10 minutos) durante la exposición de la muestra de 2500 ng/L a la radiación solar. El incremento de temperatura se da como consecuencia de la radiación infrarroja que llega al colector junto con el resto de la radiación electromagnética que proviene del sol.

Tabla 4.11. Datos obtenidos en el experimento de degradación de 2000 ng/L de carbamazepina

MUESTRA	TIEMPO DE RESIDENCIA (MIN)	PH	TEMPERATURA	RADIACIÓN (WATT/M ²)	ENERGÍA ACUMULADA (KJ/L)
0	0	6.48	27	42.45	0
1	10	4.57	28	41.40	2.56
2	20	6.81	29	40.90	5.02
3	30	6.95	30	39.75	7.40
4	40	6.98	31	39.15	9.62
5	50	6.96	32	38.15	11.79
6	60	6.67	33	37.30	13.89

Como se sabe la temperatura tiene efecto sobre la velocidad de las reacciones, en una proporción determinada cuantitativamente por la ecuación de Arrhenius ($k = Ae^{-E_a/RT}$ donde k es la constante de velocidad de reacción, A es un factor de proporcionalidad, E_a es la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta expresada en °K). En estas pruebas la temperatura no se ha controlado, pero al aumentar conforme avanza la prueba, es de esperarse que se favorezcan las diversas reacciones de oxidación que están sucediendo dentro del fotorreactor.

La Fig. 4.11 ilustra los resultados obtenidos para la oxidación de carbamazepina a diferentes concentraciones del fármaco.

Al observar las gráficas, es evidente que el porcentaje de degradación alcanzado es mayor a medida que se trabajan concentraciones menores del fármaco. Este resultado coincide con las tendencias publicadas para este tipo de procesos de oxidación. Se realizó la evaluación del proceso utilizando muestras de 500 y 150 ng/l que fueron expuestas a la radiación solar durante 3 h, es decir, se incrementó el periodo de irradiación de 1 a 3 h. Los resultados se muestran en la Fig. 4.12.

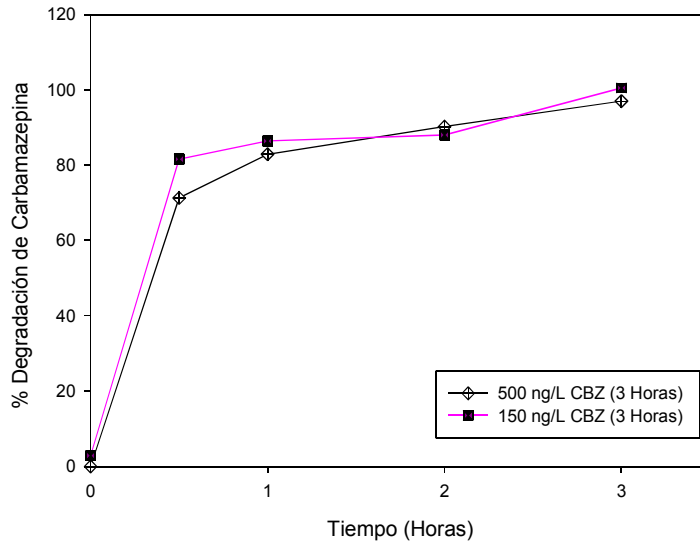


Fig. 4.11. Curvas de degradación a 1 h de exposición para diferentes concentraciones de CBZ

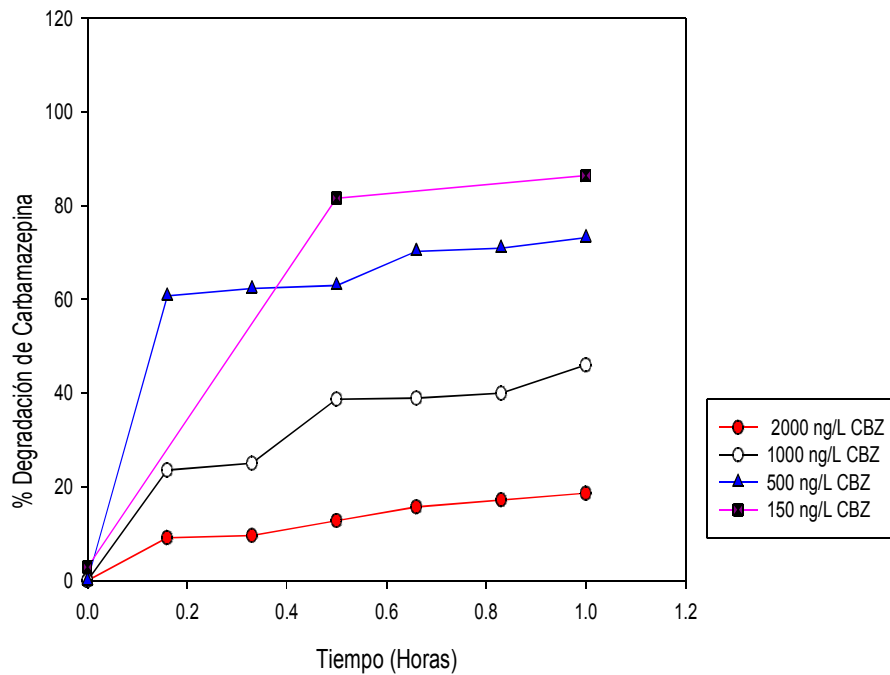


Fig. 4.12. Degradación de carbamazepina dependiente de la dosis

4.6.3.3 Tratamiento de una muestra sintética en el concentrador solar

Las concentraciones de los fármacos en la muestra sintética antes y después del tratamiento por fotocátalisis heterogénea se resumen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Concentraciones de fármacos en la muestra sintética, antes y después del tratamiento por fotocátalisis heterogénea

COMPUESTO	LD	APROXIMACIÓN A CONCENTRACIÓN ESPERADA (%)	CONCENTRACIÓN REAL EN LA ENTRADA (NG/L)	SALIDA (NG/L)	REMOCIÓN (%)
Eritromicina	0.521; 0.48	67	0.908	0.357	60.68
Sulfametoxasol	1.97; 1.45	89	20.3	3.2	84.24
Cafeína	15.6; 14.5	99	24.1	25.2	NA
Metilprednisolona	12.9; 13.3	-----	ND	ND	NA
DEET	0.313; 0.29	321	6.45	2.87	55.50
Carbamazepina	0.625; 0.58	90	1350	340	74.81

En la literatura es difícil encontrar trabajos en los que se haya evaluado la fotocátalisis heterogénea para el tratamiento de concentraciones de fármacos tan bajas como las que se abordaron en este estudio, debido muy probablemente a que la cuantificación a ese nivel es muy especializada y costosa.

De manera general, las degradaciones observadas fueron mayores al 50 % independientemente de su concentración inicial. La sustancia que alcanzó mayor porcentaje de oxidación fue la carbamazepina que fue transformada en un 75%, en tanto que para la cafeína no se observó cambio en la concentración.

4.6.3.4 Conclusiones

Los resultados aquí obtenidos permiten establecer escenarios para la aplicación de la fotocátalisis heterogénea con TiO_2 para el tratamiento de salmueras o rechazos obtenidos del tratamiento por ósmosis inversa de agua subterránea en donde se encuentren contaminantes emergentes.

Particularmente, las concentraciones de CBZ encontradas en las fuentes de abastecimiento del Valle del Mezquital oscilaron entre los 7 y los 15 ng/L. Después de un proceso de nanofiltración, las concentraciones de los solutos en el agua de rechazo se incrementan del orden de unas 5 veces, por lo que, en el peor de los escenarios, la concentración de CBZ no rebasará los 100 ng/L. De esta manera se puede garantizar que si se trata una salmuera con algunas decenas

de ng/L de CBZ por el método fotocatalisis heterogénea aquí propuesto, más del 90% del compuesto será oxidado para periodos de irradiación de 3 h.

En general las eficiencias de los procesos de oxidación avanzada se modifican hacia la baja cuando el proceso se aplica a una mezcla en la existen varios solutos, por lo que se aconseja verificar la eficiencia del sistema en agua sintética y real en donde se tengan más compuestos presentes, porque de hecho, en un sistema real lo más probable es que se encuentre una mezcla de compuestos emergentes.

A fin de estimar la efectividad en este escenario, se preparó una muestra sintética que se sometió al tratamiento fotocatalítico. Las concentraciones cuantificadas en la muestra sintética coincidieron muy bien con las adicionadas, excepto para el caso del DEET. De acuerdo con la concentración de ingrediente activo marcada en la etiqueta del producto utilizado y considerando las diluciones realizadas, se esperaba una concentración del orden de 2.5 ng/L. El laboratorio cuantificó 6.45 ng/L a las muestras sintética, lo que en porcentaje representa un 320% más. Es posible que esta diferencia se deba a una combinación de factores, desde preparación de la muestra, hasta detalles en la cuantificación. Es frecuente que para concentraciones tan bajas, aunque se lleve un control estricto de control de calidad, en ocasiones los porcentajes de recuperación quedan fuera de los intervalos de aceptación. Al tratarse de concentraciones tan bajas este no es un resultado que deba alarmar, lo que es importante es que se tomaron como válidos los valores de concentración a la entrada y salida, con lo que se estableció el porcentaje de remoción.

En nuestro caso, se trabajó una mezcla, y aunque las concentraciones de los solutos no se encontraban en el mismo orden de magnitud, si lo estuvieron en cuanto a los porcentajes de oxidación alcanzados, en la mayoría fueron superiores al 50% y de hecho la CBZ presente en el orden de 1500 ng/L logró transformarse en un 75%.

La excepción se presentó para la cafeína, que aparentemente no sufrió oxidación. Cabe mencionar también que la metilprednisolona no logró ser determinada ni siquiera en la muestra inicial, debido a que se preparó a una concentración muy cercana al límite de detección.

No se cuenta con suficiente información para determinar lo sucedido con la cafeína, como se mencionó en la sección 3.1.1.3.13.5 en un trabajo se habla de una oxidación casi completa después de 6h y en otro trabajo, en donde se utilizó cafeína 10^{-4} M ésta se degradó en un 90% después de 150 min. Es en este último trabajo en donde refieren las propiedades antioxidantes de la cafeína y su capacidad para secuestrar radicales libres, sin embargo no se tiene más evidencia ni razón para explicar que la concentración de este compuesto, bajo las condiciones probadas, haya permanecido sin cambio durante el tratamiento.

Todos los demás compuestos fueron oxidados en mayor o menor grado, como sería de esperar para un sistema poco selectivo como la fotocátalisis heterogénea. Por las concentraciones que se manejaron era difícil realizar alguna otra determinación como COT, o detección de productos de oxidación, por lo que esta prueba aunque a nivel demostrativo ilustra el potencial que esta técnica tiene para el tratamiento de agua y/o salmueras conteniendo este tipo de compuestos emergentes.

4.7 NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN Y CONCLUSIONES

En el terreno de los procesos avanzados de oxidación, los resultados que se encuentran en la literatura muestran buenas eficiencias de remoción, en tiempos del orden de minutos, aunque los resultados se encuentran casi siempre para compuestos puros, no mezclas, y casi siempre en matrices simplificadas como son agua desionizada o destilada y pocos trabajos se han realizado en matrices reales, esto es agua subterránea, superficial o incluso agua de mar.

Es por ello, que se puede afirmar que este tipo de tecnología es una opción real para el tratamiento de agua que presente contaminantes emergentes, pero que se debe explorar aún más para tener datos reales de sus costos de aplicación y también datos de su aplicabilidad a escalas mayores a las frecuentemente encontradas en la literatura que son casi siempre a nivel laboratorio.

5 HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS SANITARIOS Y AMBIENTALES. ESTADO DEL ARTE

5.1 INTRODUCCIÓN

El presente capítulo constituye una síntesis de temas relevantes en la evolución de las pruebas de toxicidad en el contexto de la evaluación de riesgos a la salud humana asociados con la exposición a compuestos químicos ambientales, partiendo de la importante interconexión que hay entre la salud pública, las ciencias ambientales, la toxicología, la farmacología y, las ciencias emergentes como son la bioinformática, quimioinformática, genómica, proteómica y metabolómica para el mejor entendimiento de la influencia que los compuestos químicos presentes en el ambiente tienen sobre la salud humana.

Hay miles de compuestos químicos necesarios para la vida cotidiana, crecimiento económico, bienestar y salud, que incluyen químicos industriales, plaguicidas, medicamentos, productos para la higiene y cuidado personal, así como otras moléculas farmacológicamente activas e ingredientes inertes, que constituyen una fuente ambiental de exposición humana a xenobióticos potencialmente significativa y para los cuales la información toxicológica es limitada o simplemente no existe [Judson, *et al.*, 2010], por tanto, se carece de información fundamental para fijar estándares regulatorios cuyo objetivo es la protección de la salud pública y de los ecosistemas.

Asimismo, se presenta el problema de la exposición concomitante (compuestos naturales y sintéticos) y a mezclas cuyos efectos resultan en la afectación del balance entre los diferentes elementos en los sistemas complejos [Gee, 2006]; estas exposiciones a contaminantes diversos tienen con frecuencia el potencial para actuar de manera sinérgica, aditiva o potenciada sobre los organismos, dando lugar a disrupción endocrina, impactos generacionales, dificultad para diferenciar entre efectos benignos y adversos tales como carcinogenicidad, mutagenicidad, neurotoxicidad y otros efectos sistémicos.

Por otro lado, los avances en genómica, proteómica, metabolómica, genética y epigenética, están generando una cantidad importante de información en un tiempo relativamente corto [NRC, 2007], de tal manera que la capacidad humana para detectar compuestos químicos en sistemas biológicos y ambientales está lejos de alcanzar nuestra capacidad para interpretar su relevancia para la salud pública [Nachman, *et al.*, 2011].

Estos huecos en la información y el conocimiento, se deben en gran medida a factores éticos y, a los altos costos y períodos de tiempo requeridos para llevar a cabo estudios epidemiológicos y ensayos en animales. Por ejemplo, en Estados Unidos [Judson, *et al.*, 2009], una batería completa de pruebas regulatorias para un solo compuesto químico (incluyendo las dirigidas a determinar carcinogenicidad y efectos crónicos, toxicidad reproductiva y del desarrollo), requiere cientos de animales y una inversión de millones de dólares.

Evidentemente los ensayos en modelos animales e *in vitro* proporcionan información valiosa; sin embargo, ésta es limitada en cuanto a los mecanismos de acción y por ende de las vías celulares que podrían llevar a la toxicidad en humanos. Dicha información, mecanista, es clave para ir más allá de los actuales paradigmas en la estimación de los riesgos a la salud humana a niveles de exposición realistas [Judson, *et al.*, 2010].

Las actuales estrategias de prueba de toxicidad descansan principalmente en la observación de respuestas adversas de los animales de laboratorio tratados con altas dosis de los compuestos químicos de interés. Las inferencias acerca de los riesgos para las poblaciones humanas basadas en estas observaciones, requieren extrapolaciones inciertas, primero de altas dosis a los niveles ambientales (usualmente varios órdenes de magnitud por debajo de las probadas en el laboratorio), y segundo la extrapolación de animales a humanos [Andersen y Krewski, 2009].

Por lo anterior, el Consejo Nacional de Investigación (NRC, por sus siglas en inglés) de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, actualmente promueve la transformación de las pruebas de toxicidad a través del entendimiento de las vías o rutas moleculares, esto es, el papel de las moléculas en la función celular y la toxicidad; en respuesta, diversos grupos de investigación han acelerado los esfuerzos para aplicar enfoques de tamizaje con un alto flujo y contenido de información para la priorización de compuestos químicos y pruebas de toxicidad, lo cual resulta en la disponibilidad explosiva de datos de ensayos de toxicidad *in vitro* [Cohen, 2009].

Entre las varias opciones de ensayos de toxicidad, el Comité en Pruebas de Toxicidad y Evaluación de Riesgos Ambientales (Comité) del NRC, intenta definir un paradigma de evaluación de riesgos que como se ilustra en la Fig. 5.1 permita [NRC, 2006; NRC, 2007; Andersen y Krewski, 2009]:

- e) Lograr una amplia cobertura de compuestos químicos, mezclas, resultados y estadios de vida
- f) Reducir los costos y tiempos requeridos para llevar a cabo las pruebas de toxicidad
- g) Desarrollar bases científicas más robustas para evaluar efectos a la salud asociados con químicos ambientales

h) Minimizar el uso y sufrimiento de animales en los ensayos o pruebas de toxicidad

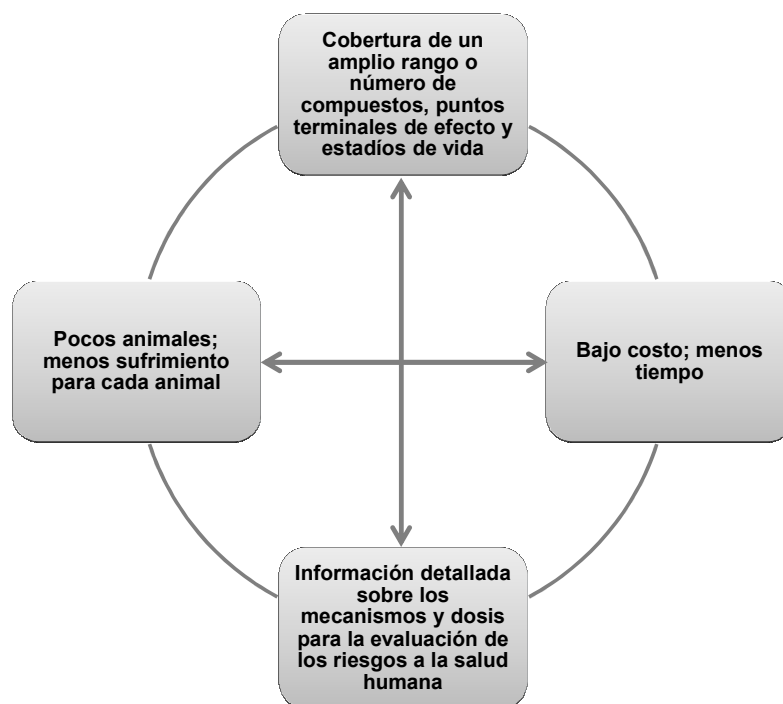


Fig. 5.1. Los objetivos de las pruebas de toxicidad en el nuevo paradigma de evaluación de riesgos a las salud humana [NRC, 2006]

En este entorno, el Comité prevé el uso de los métodos computacionales y toxicología *in silico* en la fase de caracterización de los compuestos químicos a evaluar, para estimar o predecir sus propiedades fisicoquímicas y si es posible sus potencialidades toxicológicas [Andersen y Krewski, 2009]. Esto es, la aplicación de modelos matemáticos y de cómputo para predecir el efecto de los agentes ambientales y dilucidar la cascada de eventos que propician una respuesta adversa [NRC, 2006].

Actualmente, es posible relacionar estructuras moleculares con actividad biológica, esto es relaciones estructura actividad (SAR, por sus siglas en inglés) con resultados considerados de alta calidad y capacidad predictivas [Valleverdú, 2005]. Asimismo, los sistemas expertos y la existencia de bases de datos en red y coordinadas está dando lugar a un alto flujo de información disponible al público. Los datos se localizan e interrelacionan fácilmente.

Debe tenerse en mente que el uso de las herramientas *in vitro* y computacionales, permiten priorizar compuestos químicos y en cada caso está sujeta a validación, de tal manera que para la evaluación de riesgos es necesario contar con información basada en población [NCR, 2007]:

- a) Datos de exposición humana para seleccionar las dosis de prueba y facilitar la generación de información relevante del peligro ambiental
- b) Datos de biomonitoreo relacionando la exposición humana real con concentraciones que alteran las vías de toxicidad para identificar exposiciones biológicamente relevantes
- c) Información de la susceptibilidad del hospedero y exposiciones basales para extrapolar e interpretar los resultados de las pruebas in vitro
- d) De hecho, el Comité enfatiza en la necesidad de llevar a cabo vigilancia estrecha sobre salud humana y asociar los estudios en población con los hallazgos acerca de las vías de toxicidad así como con las actividades de biomonitoreo y seguimiento de biomarcadores [Andersen y Krewski, 2009], lo cual es relevante desde el punto de vista regulatorio.

5.2 LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD EN EL CONTEXTO DE RIESGO, PROTECCIÓN DE LA SALUD HUMANA Y EL AMBIENTE

Una de las principales aplicaciones de las pruebas de toxicidad se encuentra en el proceso de evaluación de riesgos a la salud humana por exposición a agentes ambientales. En 2005, la USEPA, con el apoyo del Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos (US NTP, por sus siglas en inglés), inició un proyecto en el Consejo Nacional de Investigación (NRC), cuya finalidad fue desarrollar una visión de largo plazo para las pruebas de toxicidad, así como un plan estratégico para implementar esta visión, lo que requiere de la evaluación de los métodos de prueba y de los actuales paradigmas para satisfacer las necesidades regulatorias a futuro [Collins, *et al.*, 2008]. Los retos de esta iniciativa incluyen:

- a) Un vasto número de compuestos a ser probados para evaluar los riesgos a la salud humana y al ambiente
- b) Incorporar los recientes avances en toxicología molecular, ciencias de la computación y tecnologías para manejo y comunicación de la información
- c) Dependencia de los datos obtenidos en ensayos animales para inferir los efectos en humanos
- d) Ofrecer mayor eficiencia en diseño y costos.

Para ejemplificar y tratar de dimensionar lo anterior, a diciembre de 2011, se habían registrado más de 62 millones de compuestos químicos en el Chemical Abstracts Service (CAS). Afortunadamente las poblaciones humanas, la flora y fauna silvestres, no están expuestas a

este universo de moléculas; sin embargo, es importante considerar que hay una fracción de estos compuestos, para los cuales pueden existir exposiciones ambientalmente relevantes y que si bien pueden ser voluntarias como es el caso de los cosméticos y medicamentos, con frecuencia pasan inadvertidas como ocurre con productos químicos de uso industrial, plaguicidas y subproductos de desinfección del agua de consumo humano.

Así, en el contexto riesgo, las pruebas de toxicidad son una herramienta de soporte para la toma de decisiones en escenarios que incluyen tanto agentes ambientales potenciales, como agentes ambientales existentes, sitios contaminados, ambientes que son factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades, y el riesgo relativo de diferentes agentes.

Hay situaciones en las cuales es necesario obtener en poco tiempo, información a partir de un tamizaje para decenas o cientos de agentes ambientales; en tanto que en otras se requiere datos dosis-respuesta con una precisión tal, que permita evaluar exposiciones ambientalmente relevantes, esto es a concentraciones bajas o traza, y en algunas otras se requiere probar la toxicidad de mezclas o bien el uso de ensayos enfocados a mecanismos específicos de toxicidad. Asimismo, algunos contextos de riesgo, pueden requerir el uso de aproximaciones obtenidas de estudios en población y biomonitorio, o bien en ensayos que proporcional gran cantidad de información a partir de células humanas, líneas celulares y componentes que permiten evaluar alteraciones biológicas importantes y las principales vías de toxicidad.

En cualquier caso, la evaluación de riesgos requiere el uso de datos que proceden de diferentes fuentes de información, incluyendo estudios en animales de laboratorio, ensayos clínicos, estudios epidemiológicos y, estudios de cultivos celulares ya sea de células animales o humanas. El conjunto de datos seleccionados se interpretan y con esta base se evalúan los riesgos potenciales a la salud humana y al ambiente.

No obstante que este proceso se basa en el análisis de información y datos científicos, generalmente hay huecos en el conocimiento y los datos fundamentales no son del todo suficientes o adecuados, por lo que depende de modelos, extrapolación y otros métodos de inferencia, y por tanto es necesario contar con modelos matemáticos además de incluir factores de seguridad, considerar supuestos y llevar a cabo un profundo análisis de incertidumbre.

De lo anterior, resulta clara la importancia que la caracterización de la exposición tiene en el proceso de evaluación de riesgos a la salud pública, de tal manera que en el marco de la transformación de las pruebas de toxicidad propuesta por el NRC en su informe sobre las pruebas de toxicidad para el siglo 21, se requiere una nueva generación de herramientas que permitan evaluaciones de riesgo con enfoque holístico, aplicando datos generados mediante

pruebas *in vitro* e *in silico* para caracterizar exposiciones biológicamente relevantes y asociarlas con peligros ambientalmente relevantes.

Así, el marco desarrollado por el Comité del NRC [2007] para las pruebas de toxicidad en el siglo 21, tiene cuatro componentes principales (Fig. 5.2): caracterización del compuesto químico; vías de toxicidad y pruebas blanco; modelación dosis-respuesta y extrapolación, y datos de exposición humana basados en población.

En la caracterización química se recopilarán datos sobre propiedades físicas y químicas del



compuesto, uso, posibles concentraciones ambientales, persistencia, bioacumulación, metabolitos y productos de descomposición, interacciones moleculares iniciales de compuestos y metabolitos con componentes celulares y posibles propiedades tóxicas. Una variedad de métodos computacionales tales como los modelos estructura-actividad puede utilizarse para predecir las propiedades, características y toxicidad.

Fig. 5.2. Componentes de las pruebas de toxicidad Esquema para la nueva visión [NRC, 2007]

Después de la caracterización química, podría tomar decisiones acerca de qué pruebas adicionales son necesarias o si no es necesario continuar. En general, se espera que esta caracterización no sea suficiente, y por tanto es necesario llevar a cabo pruebas de toxicidad, que deberán ser dirigidas a las vías de toxicidad y a los efectos o blancos específicos. Se espera que los ensayos predictivos basados en las vías de toxicidad sean una componente central de una estrategia más amplia para evaluar la actividad biológica de compuestos nuevos y existentes.

Las pruebas de toxicidad se diseñarían para definir relaciones dosis-respuesta para las vías alteraciones y vías de toxicidad que se esperara resultarían en un efecto adverso a la salud humana si las alteraciones se mantuvieran *in vivo* a un nivel de intensidad suficiente (dosis) y para un período de exposición suficientemente prolongado.

Como se ilustra en la Fig. 5.3, las alteraciones iniciales en las señales características de las células, circuitos genéticos, y redes de respuesta celular, son resultado de la exposición a compuestos químicos que eventualmente pueden provocar enfermedad.

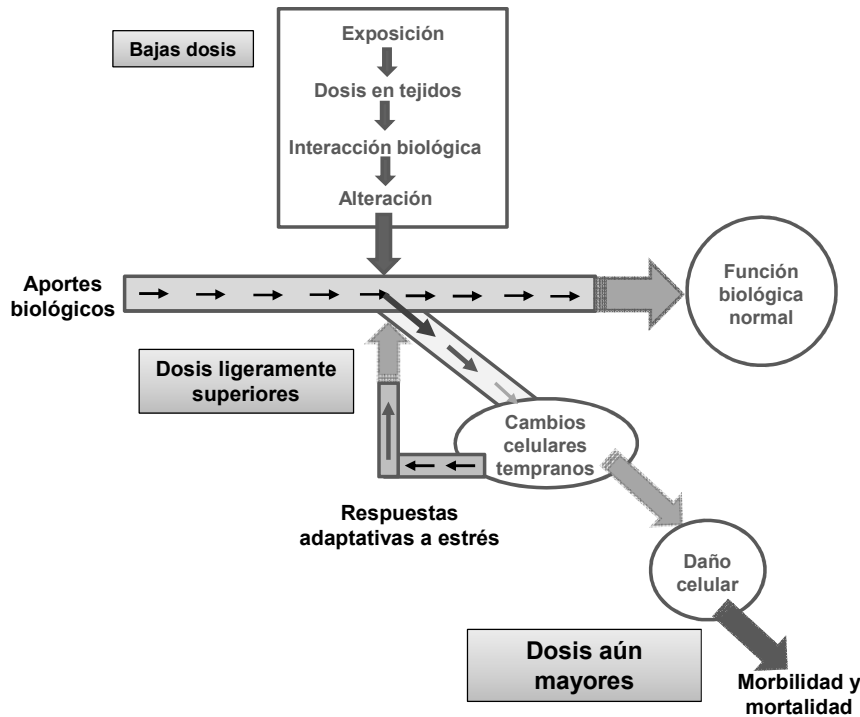


Fig. 5.3. Respuestas biológicas observadas, resultantes de la intersección de la exposición y la función biológica [Andersen y Krewski, 2009; NRC, 2007]

La intersección da lugar a la alteración de las vías biológicas, cuando las alteraciones son suficientemente altas o el huésped no es capaz de adaptarse debido a factores nutricionales, genéticos, estatus de salud, edad o inmunocompromiso, se presenta toxicidad y enfermedad [Andersen y Krewski, 2009; NRC, 2007]

En ocasiones, cuando las exposiciones son a bajas dosis, los sistemas biológicos pueden funcionar normalmente dentro de los límites homeostáticos, con dosis ligeramente superiores, puede haber una clara respuesta adversa, a la cual algunos organismos podrán eventualmente adaptarse, pero las subpoblaciones sensibles seguramente no tendrán esta capacidad. Si las exposiciones son más intensas o persistentes, puede haber alteraciones irreversibles que resultan en efectos adversos a la salud [NRC, 2007].

El conjunto de herramientas y metodologías que podrían estar involucradas en los nuevos protocolos de pruebas de toxicidad y en la interpretación de los resultados de estas pruebas cubren un amplio espectro dentro de la biología moderna (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Herramientas para pruebas de toxicidad y su aplicación en la evaluación de riesgos

HERRAMIENTA	APLICACIONES
Tamizaje de alto desempeño	Identifica eficientemente vías críticas de toxicidad, alteraciones a través de un rango de dosis y blancos moleculares y celulares
Biología de células madre	Desarrollo de ensayos de toxicidad <i>in vitro</i> , usando células humanas producidas a partir de diferenciación celular
Genómica funcional	Identifica la estructura de circuitos celulares involucrados en las vías de toxicidad para ayudar en la modelación computacional dosis-respuesta
Bioinformática	Interpreta datos multivariados complejos de HTS y ensayos genómicos con relación a la identificación de blancos y efectos de alteraciones sostenidas sobre órganos y tejidos
Biología de sistemas	Organiza la información de vías múltiples de respuesta celular para entender respuestas celulares y titulares integradas
Sistemas de biología computacional	Describe relaciones dosis-respuesta con base en alteraciones del circuito celular por debajo de los umbrales que dan lugar a respuesta tóxica, transiciones dosis-dependiente, y otras conductas biológicas relacionadas con la dosis
Modelos biológicos farmacocinéticos (PBPK)	Identifica situaciones de exposición humana para proporcionar información de la concentraciones en tejidos equivalentes a la activación de las vías de toxicidad <i>in vitro</i>
Relaciones estructura actividad	Predice respuestas toxicológicas y vías metabólicas con base en las propiedades químicas de los agentes ambientales y los compara con otras estructuras activas
Biomarcadores	Indican cambios biológicos alteraciones y vías de toxicidad crítica

Fuente: tomada de Andersen y Krewski, 2009

Kavlock, *et al.* [2007], sintetiza la aplicación de las áreas de la toxicología computacional en la evaluación de riesgos y la visión de las pruebas de toxicidad para el siglo 21 del NRC como sigue (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Áreas de aplicación de la toxicología computacional y componentes de las pruebas de toxicidad

PARADIGMA DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD Y TOXICOLOGÍA COMPUTACIONAL	PARADIGMA DE EVALUACIÓN DE RIESGO*			
	IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO	EVALUACIÓN DOSIS-RESPUESTA	EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN	CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO
Paradigma de las pruebas de toxicidad [NRC, 1983]	Caracterización del químico	Pruebas de toxicidad; vías de toxicidad; Ensayos blanco; Dosis-respuesta y modelos de extrapolación	Contextos o escenarios de riesgo (datos poblacionales y de exposición)	
Modelos de transformación y	+++		++	

PARADIGMA DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD Y TOXICOLOGÍA COMPUTACIONAL	PARADIGMA DE EVALUACIÓN DE RIESGO*			
	IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO	EVALUACIÓN DOSIS-RESPUESTA	EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN	CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO
transporte				
Toxicoinformática	+++	++		
Modelación molecular	+++	++		
Tamizaje de alto rendimiento	+++	+++		
Genómica		++		
Redes de señales celulares		++		
Modelos de sistemas biológicos		+++		
Análisis de incertidumbre		+++	++	
Variabilidad genética		++	+++	
Tejidos virtuales		+++		

De acuerdo con la visión del comité, las pruebas sobre efectos o blancos específicos, las cuales pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*, se utilizarían para complementar las pruebas de las vías de toxicidad y asegurar evaluación adecuada, esto es, se usarían para:

- Clarificar incertidumbres sustantivas en la interpretación de los datos de las vías de toxicidad
- Entender efectos de compuestos prototipo representativos de clases de materiales, tales como nanopartículas, que pueden activar vías de toxicidad no incluidas en un conjunto estándar de pruebas de toxicidad
- Refinar la estimación del riesgo cuando el blanco probado puede reducir la incertidumbre y se requiere una estimación más precisa para la toma de decisiones
- Investigar la formación de metabolitos tóxicos
- Cubrir huecos en las estrategias de las pruebas para las vías de toxicidad, asegurando que las vías críticas y puntos terminales (efecto) son adecuadamente cubiertas

Los modelos dosis-respuesta básicamente se desarrollarían con bases de datos mecanicistas y ensayos *in vitro*, para describir la relación entre la concentración en el medio de prueba y el grado de respuesta *in vitro*. En la extrapolación el modelo estima las exposiciones o ingreso del compuesto químico al organismo, que darían lugar a concentraciones tisulares similares a aquéllas que *in vitro* se asociaron con alteraciones de las vías de toxicidad y que podrían representar factores de toxicidad para el organismo huésped (Fig. 5.4).

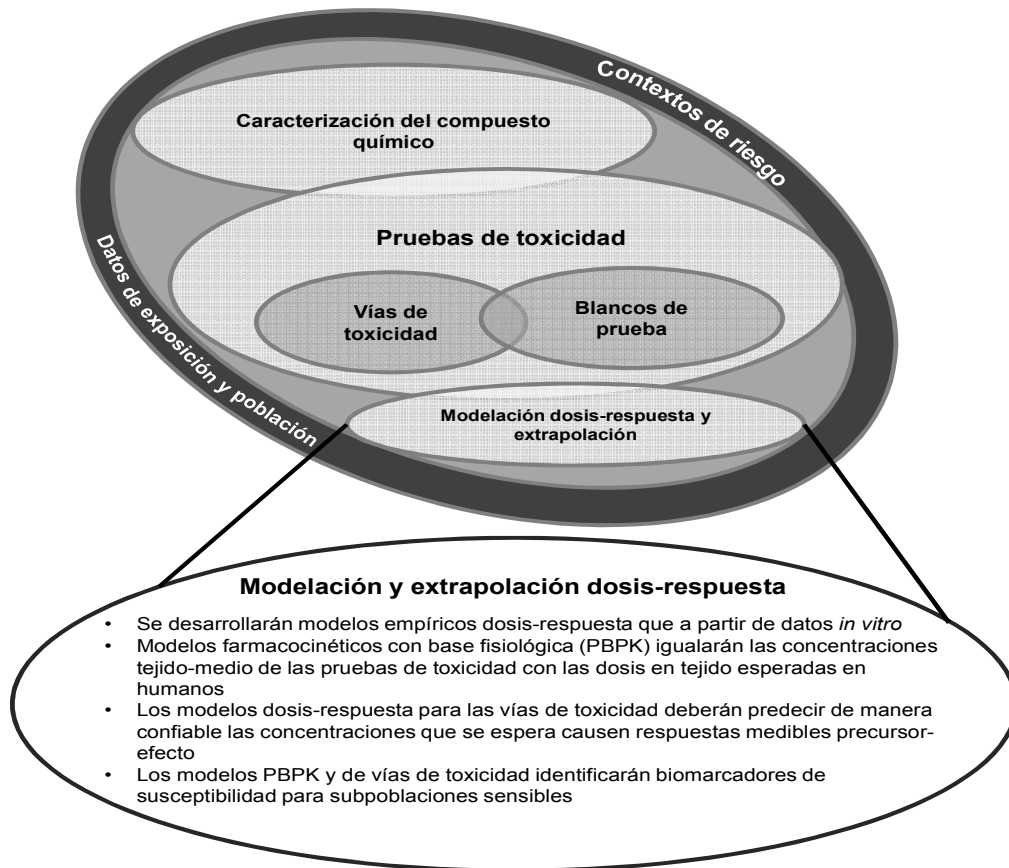


Fig. 5.4. Visión de la componente modelación y extrapolación dosis-respuesta

La interacción con estudios poblacionales mejora el diseño de cada tipo de estudio, para responder a preguntas acerca de la importancia de los factores genéticos moleculares y celulares que influyen en los riesgos de salud a nivel individual y de la población. Debido a que la visión enfatiza que los estudios con células humanas indican cómo los agentes ambientales pueden afectar las respuestas biológicas en humanos, los estudios sugerirán en su momento, el uso de biomarcadores (indicador de exposición humana, efecto o susceptibilidad) que puedan ser monitoreados en poblaciones humanas (Fig. 5.5).

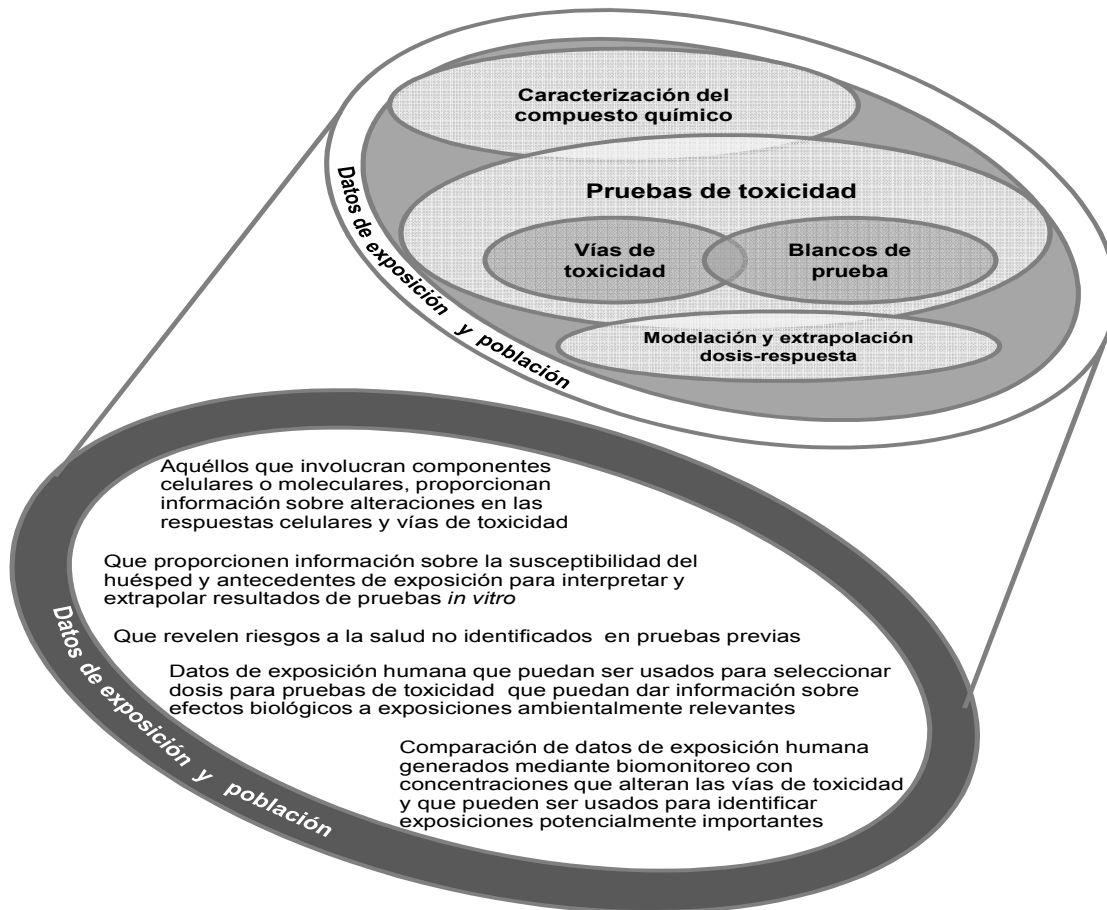


Fig. 5.5. Visión de la componente datos de exposición y población

En toda esta visión de las pruebas de toxicidad, la componente que involucra los contextos de riesgo incluye:

- Evaluación de nuevos agentes ambientales
- Evaluación de agentes ambientales existentes
- Evaluación de un sitio
- Evaluación de factores ambientales que contribuyen a enfermedades específicas
- Evaluación de los riesgos relativos asociados con agentes ambientales

De lo anterior, es posible concluir que la visión del Comité del NRC sobre las pruebas de toxicidad es consistente con el paradigma de evaluación de riesgos propuesto por el NRC en 1983, y con el proceso de evaluación de riesgos a la salud de la USEPA [1989], como se ilustra en la Fig. 5.6.

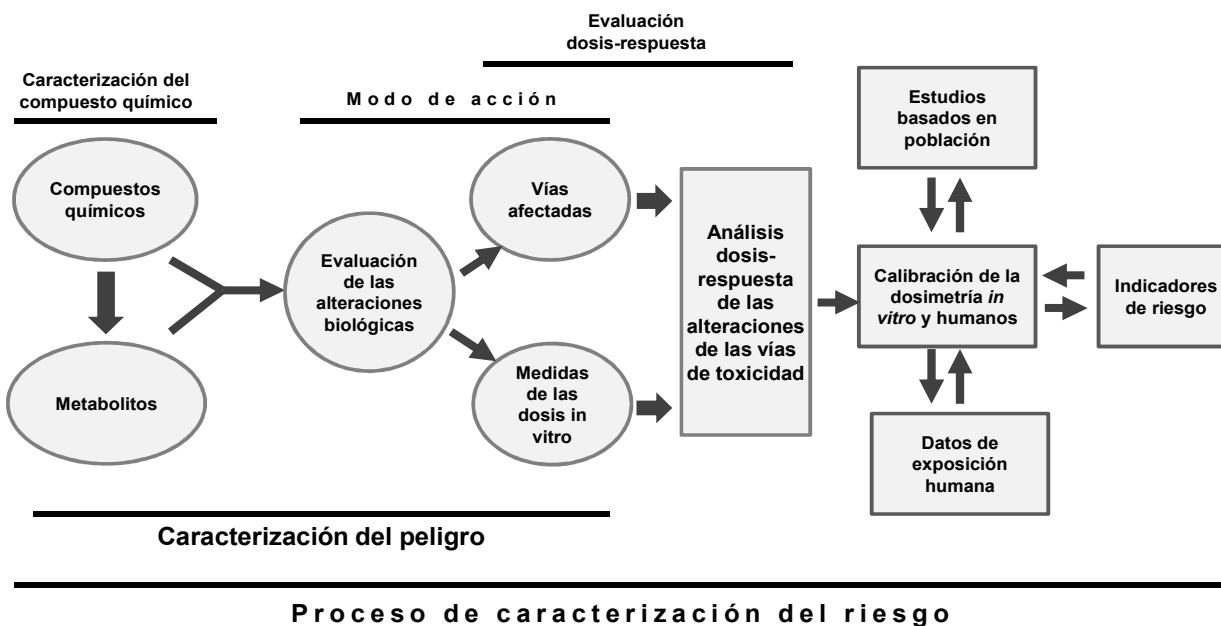


Fig. 5.6. Componentes de la evaluación de riesgo [NRC, 2007]

5.3 TOXICOLOGÍA COMPUTACIONAL O *IN SILICO*-MÉTODOS DE NO-ENSAYO

Actualmente, los países miembros de la Unión Europea, así como Estados Unidos y agencias internacionales como la OCDE, se encuentran revisando las políticas de evaluación de producto químicos, que ha generado controversia con respecto a las pruebas de toxicidad, necesarias para la evaluación de riesgos a la salud humana y ambiental, evitando los ensayos en modelos animales (*in vivo*), e incrementar el número de compuestos y la gama de efectos tóxicos a evaluar, ahorrando tiempo y recursos. En el presente, una alternativa a la experimentación en modelos animales, son los sistemas de computacionales o "*in silico*", que utilizan modelos de predicción de la toxicidad basados en la evaluación de las relaciones estructura actividad, tanto a nivel cualitativo (SAR, por sus siglas en inglés) como cuantitativo (QSAR, por sus siglas en inglés).

Parte de la controversia, radica en los aspectos regulatorios en materia de protección de la salud pública y ambiental, no obstante, es de esperarse que en la medida en que estos modelos predictivos sean más robustos y más ampliamente utilizados, serán mejor aceptados por la comunidad científica y autoridades regulatorias, lo que repercutirá en el bienestar de las especies animales que se utilizan para experimentación y fortalecerá las evaluaciones de riesgo en términos del costo-efectividad-tiempo.

5.3.1 GENERALIDADES

In silico es una expresión acuñada por analogía con los ensayos o pruebas *in vivo* e *in vitro*, que denota “realizar en computadora o simular vía computadora”, por lo que puede decirse que en su más amplio sentido, la toxicología *in silico* significa cualquier cosa que pueda hacerse con una computadora en toxicología [Simon-Hettich, *et al.*, 2006; Hartung y Hoffman, 2009; Raunio, 211].

La USEPA [2003], definió a la toxicología computacional como la aplicación de modelos matemáticos y de cómputo para predecir el efecto de agentes ambientales y dilucidar la cascada de eventos que dan como resultado un efecto adverso.

La definición de Hartung y Hoffman [2009], como cualquier cosa que podamos hacer con una computadora en toxicología, es muy amplia, ya que en la actualidad serían pocas las pruebas que no caerían en esta definición, pues la computadora es una herramienta que se utiliza para el diseño o planeación de experimentos o bien para el análisis de datos.

Las herramientas que utiliza se listan a continuación [NCR, 2006]:

- a) Química computacional o quimioinformática (la simulación asistida por computadora de los sistemas moleculares)
- b) Biología molecular (caracterización genética, síntesis de proteína y otros eventos moleculares involucrados en la respuesta biológica a un agente)
- c) Bioinformática (colección asistida por computadora, organización y análisis de grandes conjuntos de datos de información biológica)
- d) Biología de sistemas (modelación matemática de sistemas y fenómenos biológicos)

Así, el objetivo del uso de a toxicología computacional es establecer prioridades entre los diversos químicos con base en el tamizaje y datos de ensayos o pruebas, y desarrollar modelos predictivos para la evaluación cuantitativa de riesgos; como en el caso de otros enfoques no animales de la toxicología, tiene el potencial para disminuir la tensión entre los cuatro objetivos de los esquemas de prueba regulatorios (amplitud, profundidad, bienestar animal y conservación).

No obstante, es importante anotar que aunque el enfoque de la modelación computacional tiene una clara ventaja en tiempo y potencialidad para reducir el número de ensayos en animales, el éxito y validación de cualquier modelo, depende del efecto o punto final a ser modelado, así como de la calidad, volumen y diversidad química incluidos en el conjunto de datos usados para generar el modelo, de tal manera que para que una evaluación de riesgo sea válida, la

aproximación computacional debe ser validada, adecuadamente explicada y accesible para la revisión por parte de expertos, esto es, por los pares de quienes desarrollan el modelo; un modelo no validado puede ser utilizado en estudios de investigación, pero no para fines regulatorios o normativos.

La toxicología *in silico* difiere de la toxicología tradicional en muchos sentidos, pero la principal diferencia se encuentra en la escala, esto es el número de químicos que es posible estudiar, la amplitud de los efectos y vías cubiertos, los niveles de organización biológica examinados, y el rango de escenarios de exposición que es posible considerar simultáneamente [Kavlock, et al., 2008].

Con respecto a los métodos *in silico*, destacan las técnicas de análisis cuantitativo de las relaciones estructura actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) para el desarrollo de modelos, las cuales han influido de manera importante desde hace aproximadamente 50 años. Los modelos, generados en computadoras personales, se obtienen de datos existente sobre pruebas en animales junto con una evaluación estadística de su exactitud, reproducibilidad o de cálculos y predicciones *in silico*. Otros métodos computacionales incluyen: modelos de simulación cinética con base fisiológica (PBKM, por sus siglas en inglés), similaridad biológica y ecuaciones alométricas, sistemas expertos soportados en bases de conocimiento, reglas y QSAR, modelos construidos mediante gráficas moleculares y redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés).

Los métodos *in silico* pertenecen a la familia de métodos alternativos en toxicología, los cuales se consideran especialmente adecuados para probar la toxicidad de compuestos químicos viejos y nuevos e identificar su peligrosidad [Tichý, 2005], con miras a mejorar la protección del ambiente y la salud humana fortaleciendo la competitividad industrial y el desarrollo económico.

En términos generales, los métodos no prueba pueden dividirse en globales, que son los que diversos autores, entre ellos Helma, llaman sistemas expertos, y los específicos que a su vez se dividen en técnicas basadas en ligandos y técnicas basadas en blancos.

De acuerdo con los requerimientos de información de la Agencia Europea de Químicos (ECHA, por sus siglas en inglés), para evaluar la seguridad de sustancias químicas, los datos no prueba pueden generarse principalmente mediante tres aproximaciones o enfoques: a) agrupamiento en categorías químicas; b) relaciones estructura actividad (SAR) y relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) y, c) sistemas expertos [ECHA, 2008]; en los tres casos subyace el supuesto de que compuestos similares dan lugar a respuestas biológicas similares.

Helma [2004], clasifica las técnicas predictivas de toxicidad *in silico* en tres grandes grupos:

- a) Métodos de que modelan eventos bioquímicos relevantes para la toxicidad (modelación molecular)
- b) Técnicas que mimetizan o simulan el razonamiento humano sobre fenómenos toxicológicos (sistemas expertos)
- c) Métodos que derivan predicciones a partir del tratamiento de datos determinados experimentalmente (sistemas de datos dirigidos)

Por su parte, Hartung y Hoffman [2009], identifican nueve tipos de aproximaciones o herramientas *in silico*:

- d) Planeación de experimentos y análisis de poder, p. ej., para mejorar el diseño de experimentos *in vivo* e *in vitro*, determinar precisión, exactitud, sensibilidad y reproducibilidad
- e) Análisis de datos
- f) Análisis de datos generados en las llamadas tecnologías “omics”, que requieren de análisis avanzados tales como tecnologías de análisis de imágenes
- g) Modelos predictivos, que puede ser considerado una variante del análisis de datos para métodos alternativos

Los mismos autores plantean que los siguientes puntos de las herramientas *in silico* formalizan lo que se llama “arte de la toxicología”, conocimiento experto:

- h) Sistemas expertos que formulan reglas tales como alertas estructurales para guiar las decisiones. Generalmente estas alertas no están explícitamente formuladas, compiladas, combinadas o son herramientas tan complejas que no es posible aplicarlas sin computadora
- i) El sistema puede tomar la forma SAR, lo que significa que las alertas estructurales son formalizadas, p. ej., grupos reactivos tales como aldehídos sugieren mutagenicidad

Asimismo, en el presente, lo más prominente de las herramientas *in silico* son las relaciones estructura actividad (SAR y QSAR):

- j) Relaciones estructura actividad, éstas dirigidas a describir estructuras químicas con ciertos descriptores para correlacionarlas con efectos (biológicos) o propiedades

La modelación es una de las herramientas más ampliamente utilizadas en los métodos *in silico*:

- k) Herramientas de modelación, originadas en el desarrollo de fármacos con ayuda de computadora para modelar un receptor y probar lo adecuado de la nueva estructura para éste. El mejor ejemplo es el de la modelación de proteínas, tales como los modelos de receptores de estrógenos o varias enzimas P-450, estos modelos son generalmente tridimensionales, pero también existen los de 4 dimensiones
- l) Modelos cinéticos, están dirigidos a predecir el destino de la sustancia en el organismo humano; p. ej., absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME)

El NRC [2007], identifica actividades de modelación emergentes, destacando los modelos SAR, los farmacocinéticos con base fisiológica (PBPK), y los modelos dosis-respuesta con base biológica (BBDR), e incluye modelos computacionales que predicen transformaciones metabólicas, y modelos tridimensionales que predicen interacción de ligandos, así como tecnologías combinadas.

5.3.1.1 Factores que favorecen el desarrollo herramientas computacionales y de la toxicología *in silico* para la evaluación de riesgos a la salud humana y el ambiente

Hay factores científicos, económicos y sociales que llevan a los gobiernos, la academia y la industria a promover el desarrollo de una toxicología que no use animales y se base en herramientas predictivas. La principal aportación a la tecnología *in silico* es la de la industria farmacéutica, derivado del interés por desarrollar y descubrir drogas en menos tiempo y a menor costo. En este sentido, hay diferencias substanciales con los agentes químicos ambientales [Raunio, 2011].

Mientras las drogas se desarrollan para actuar sobre un blanco específico del organismo humano o animal, por lo que son diseñadas con propiedades fisicoquímicas que favorecen su absorción, distribución, metabolismo y excreción y, tienen patrones de uso conocidos y cuantificables; los químicos ambientales, no están diseñados con estos criterios, cubren un espacio químico muy diverso, se tiene poco conocimiento de sus perfiles biocinéticos y generalmente deben ser evaluados para niveles de exposición que difícilmente se encuentran en escenarios reales.

La Organización Mundial de la Salud [2004] define la exposición como el contacto entre un agente y un blanco exposición como el contacto entre un agente y el individuo o población blanco, en tanto que en el marco del proceso de evaluación de riesgos, la exposición aplica a un individuo o a una población como blanco de exposición a un agente químico. Sin embargo, el blanco de la exposición puede ser un órgano, tejido o célula, y el agente de la exposición

puede ser un estresante biológico, físico o psicosocial, o bien el producto de un agente determinado de exposición [Cohen, *et al.*, 2008; Cohen, 2009].

Para la Ciencia de la exposición [Birnbau, 2010], es necesario incorporar variables como estadios de vida (organismo en desarrollo, adultos, adultos mayores), la susceptibilidad genética y la interacción de factores estresantes diferentes a los químicos para la evaluación integral de factores de riesgo asociados con enfermedades ambientales complejas. Alcanzar esta meta es crítico y requiere del establecimiento de nuevas capacidades para, como ya se anotó, identificar y medir exposiciones ambientales biológicamente relevantes, que estén directamente asociados con eventos clave en los procesos de enfermedad y con el perfil de exposición del individuo.

Wild [2005], plantea la necesidad apremiante de desarrollar métodos precisos de medición de las exposiciones ambientales de un individuo partiendo del genoma del individuo. El autor sugiere que hay necesidad de un "exposoma" para que coincida con el "genoma" y atraiga la atención sobre la necesidad de avances metodológicos en la evaluación de la exposición. El "exposoma" o medición de las exposiciones ambientales a través de la vida, generaría evidencia básica para la toma de decisiones en salud pública y dirigir la salud ambiental. Weis *et al* [2005] examinan el potencial de las tecnologías emergentes para proporcionar esta nueva generación de información de la exposición.

Smith y Rappaport [2009] argumentan que si esperamos tener éxito en la identificación de la contribución de los factores ambientales en las enfermedades crónicas, "tenemos que desarrollar herramientas del siglo XXI para medir los niveles de exposición en las poblaciones humanas" y cuantificar el exposoma.

En 2010, el Comité de Ciencias Emergentes para la Toma de Decisiones en Salud, dependiente del Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental (NIEHS, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, organizó un taller que inició el debate sobre los recursos necesarios para concretar el exposoma.

5.3.1.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Como se anotó al inicio del presente capítulo, la toxicología reguladora ha puesto cada vez mayor énfasis en la evaluación de los riesgos que presentan las sustancias químicas sobre la salud pública y ambiental para lo cual realiza ensayos con animales. Debido a la presión pública y a la de los mismos científicos, existe una tendencia creciente a aplicar el principio de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) en la investigación con animales, hecho que se manifiesta en las propias legislaciones de los países, como se verá posteriormente.

La validación de un modelo consiste en hacerlo robusto o firme y así que sea confiable y aceptable. En el caso de un método alternativo, es indispensable establecer su fiabilidad y relevancia para remplazar al método tradicional *in vivo*. Este proceso es con mucha frecuencia lento y comprende desde la validación interna hasta la posterior aceptación por parte de los grupos de expertos y las autoridades reguladora.

Vinardell [2007], en su análisis sobre las alternativas a la experimentación en animales, identifica los principales problemas y barreras en el tema y sintetiza las actividades realizadas por diversos organismos a escala nacional y mundial.

En Europa existe el European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), entre cuyas funciones está promover la aceptación científica y reguladora de los ensayos sin animales, mediante la investigación, el desarrollo y validación de métodos y el establecimiento de una base de datos especializada.

En Estados Unidos, The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), con funciones similares a las de ECVAM, establece estrechos lazos de cooperación para avanzar en la búsqueda y validación de métodos alternativos. En Japón, la Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) ha realizado varios estudios de validación sometidos a la evaluación del Ministerio de Salud y Bienestar.

Entre el gran número de estudios de validación que han tenido lugar en los últimos años en Europa, Estados Unidos y Japón, hay que resaltar los realizados sobre métodos para evaluar la irritación ocular, irritación dérmica, fototoxicidad, pirógenos, embriotoxicidad y sensibilización, básicamente desarrollados por la industria farmacéutica. Los modelos SAR y QSAR fueron elegidos entre otros debido que por sus características pueden cumplir con las demandas y criterios de los programas de seguridad química.

Los principios de validación adoptados, son los que establece la OCDE desde 2004, después de analizar la complejidad de los factores involucrados en la evaluación regulatoria de los modelos QSAR, de tal manera que para fines regulatorios el modelo estará asociado con la siguiente información [Benefati, *et al.*, 2011; Tichý, 2005]:

- a) Un punto final definido (p. ej., carcinogenicidad, irritación ocular, irritación dérmica, fototoxicidad, pirógenos, embriotoxicidad y sensibilización)
- b) Un algoritmo no ambiguo
- c) Un dominio de aplicabilidad definido
- d) Medidas apropiadas de la bondad del modelo, robustez y capacidad predictiva

e) Una interpretación mecanicista, si esto es posible

La OCDE enfatiza en la evaluación estadística de los modelos, en términos del desempeño adecuado; esto es la bondad del modelo, robustez y capacidad predictiva. El cumplimiento de estos supuestos, permite el uso de los modelos QSAR no sólo para la exploración científica, sino también para fines regulatorios en la protección de la salud humana y ambiental [Benfenati, *et al.*, 2011].

Cuando se evalúa un modelo, es muy importante tener en mente el significado de los errores para las predicciones, más que simplemente el tamaño; p. ej., la subestimación (falsos negativos) o sobreestimación (falsos positivos) de la toxicidad pueden parecer equivalentes desde el punto de vista estadístico, pero no los son necesariamente en la toma de decisiones o desde la perspectiva regulatoria, la cual se inclinará hacia un modelo conservador, no así la industria para quienes un error que implica una alta toxicidad (falsos positivos), representan un costo o pérdida económica.

Por lo general, en la evaluación de riesgos, la estimación de errores se basa en los modelos de regresión, que no indican si hay sobre o subestimación. Solamente algunos modelos tienen esta capacidad y se encuentran en los proyectos DEMETRA y CAESAR, que dan diferentes pesos a la subestimación cuando se construyen los modelos, los detalles han sido descritos por Cassano *et al.* [2010].

Los modelos CAESAR están disponibles en internet, <http://www.caesar-project.eu> lo que facilita su acceso a nivel global. Lo que es importante considerar es que estos modelos QSAR son específicos para los puntos finales de efecto que incluye la REACH en Europa, y pueden ser utilizados para procesar grandes cantidades de compuestos en lotes [Benfenati, 2010]:

- a) Bioconcentración en pescado
- b) Sensibilización de la piel
- c) Mutagenicidad
- d) Carcinogenicidad
- e) Toxicidad del desarrollo

Es importante señalar la necesidad de distinguir entre un modelo validado y un modelo válido, REACH para fines regulatorios, es específico en el uso de modelos válidos, lo que requiere de a) cada modelo sea usado para un dominio de aplicabilidad específico y, b) que haya sido seguido en la práctica, esto es que el químico a ser evaluado se encuentre en el rango de químicos para los cuales el modelo fue diseñado y dirigido [Benfenati, *et al.*, 2011; Raunio, 2011].

5.3.1.3 Ventajas y limitaciones de los métodos *in silico*

Ningún método es infalible o perfecto, como cualquier otro método de prueba, los métodos *in silico* tienen ventajas y limitaciones cuando se les compara con los métodos *in vitro* o *in vivo*.

Las ventajas incluyen:

- a) Alto desempeño
- b) Bajo costo
- c) Poco tiempo para llevar a cabo la prueba
- d) Alta reproducibilidad si se utiliza el mismo modelo
- e) Pocos requerimientos
- f) Gran potencial para reducir el número de animales para pruebas *in vivo*

Las desventajas incluyen:

- a) Limitaciones de la calidad y transparencia de los datos tratados
- b) Claridad del programa (¿Qué se va a modelar?)
- c) En ocasiones hay confusión en los descriptores
- d) El dominio de aplicabilidad a veces no es claro
- e) Las características ADME, específicamente el metabolismo no es tomado en cuenta
- f) La predicción de la carcinogenicidad no trabaja sobre compuestos no genotóxicos

En el caso de los modelos SAR, es necesario tener en mente que:

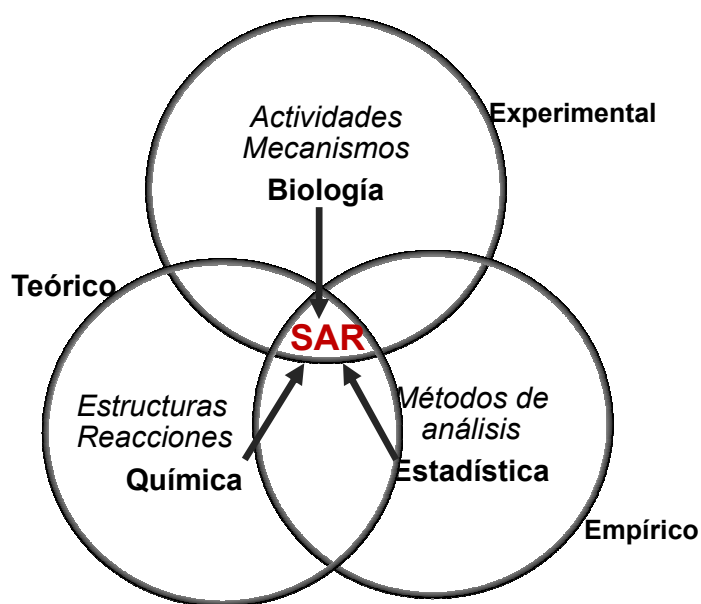
- a) No siempre es clara la correspondencia entre las propiedades fisicoquímicas y su comportamiento en el medio biológico
- b) En ocasiones la actividad biológica no está asociada con la molécula madre sino con un metabolito, cuya formación depende de variables tales como especie animal, inducción enzimática
- c) Factores toxicocinéticos que pueden diferir de una estructura molecular a otra similar (absorción, distribución, metabolismo, fijación a receptores o tejidos)

Raunio [2011], reporta que las aproximaciones QSAR presentan más del 70% de predicciones correctas (aunque no se han validado con conjuntos de datos externos), principalmente para mutagenicidad, sensibilidad y toxicidad acumulada.

5.3.2 RELACIONES ESTRUCTURA ACTIVIDAD

La tecnología estructura-actividad está basada en: a) la teoría de la toxicidad selectiva, que establece que la interacción de un tóxico con su receptor depende de las características fisicoquímicas y de la estructura molecular del compuesto y, b) en el principio de similitud, que establece que compuestos químicos con estructuras similares dan lugar a respuestas biológicas similares. Esto significa que es posible inferir las propiedades biológicas de un compuesto nuevo o desconocido, a partir de las propiedades que poseen materiales o moléculas parecidas o semejantes, cuya peligrosidad es bien conocida, por tanto, la premisa fundamental del análisis de las relaciones estructura actividad, es que la estructura molecular determina las propiedades físicas y químicas de un compuesto, lo que a su vez determina las respuestas biológicas y tóxicas [McKinney, *et al.*, 2000].

En esto consisten los llamados modelos relaciones-estructura-actividad, los cuales residen en



intersección de la biología, la química y la estadística (Fig. 5.7). Pueden ser cualitativos (SAR, por sus siglas en inglés; sólo establecen relaciones estructura-actividad) o cuantitativos (QSAR, por sus siglas en inglés; para predecir valores de toxicidad), lo cual ha sido tema de numerosas investigaciones que tratan de establecer, a través de métodos matemáticos y el uso de sistemas computacionales, una correlación directa entre alguno de los parámetros fisicoquímicos de la molécula y su actividad biológica en una serie homóloga [Reguero, *et al.*, 1989].

Fig. 5.7. Intersección que da lugar a un modelo SAR

La gran ventaja de los SARs y QSARs, sobre otros métodos de ensayo toxicológico, es que ofrecen medios para relacionar datos toxicológicos para una gama amplia de compuestos químicos y posiblemente de efectos biológicos, dando luz a asociaciones múltiples que trascienden las asociaciones particulares de los métodos de ensayo *in vitro* o *in vivo* que

prueban un compuesto químico a la vez, de aquí su capacidad para revelar información sobre los mecanismos toxicológicos que pueden generalizarse a un grupo de compuestos químicos.

5.3.2.1 Conceptos básicos en las relaciones estructura actividad

El término SAR describe una relación cualitativa, lo que significa que no hay un modelo matemático, para que el modelo sea útil en la predicción para un nuevo compuesto químico. El ejemplo más simple son las alertas estructurales, las cuales pueden ser identificadas mediante un análisis estadístico automatizado, aun cuando el modelo SAR sea cualitativo [Netzeva, *et al.*, 2005]. En general, el procedimiento para la aplicación de un modelo SAR involucra dos pasos: a) caracterización de las moléculas bajo investigación utilizando métodos computacionales, químicos y biológicos, y b) aplicación de métodos quimiométricos para explorar patrones de datos o establecer las asociaciones entre la estructura y actividad o propiedad [Tong, *et al.*, 2003], ya sea biológica o tóxica con un enfoque mecanicista, como se ilustra en la Fig. 5.8.

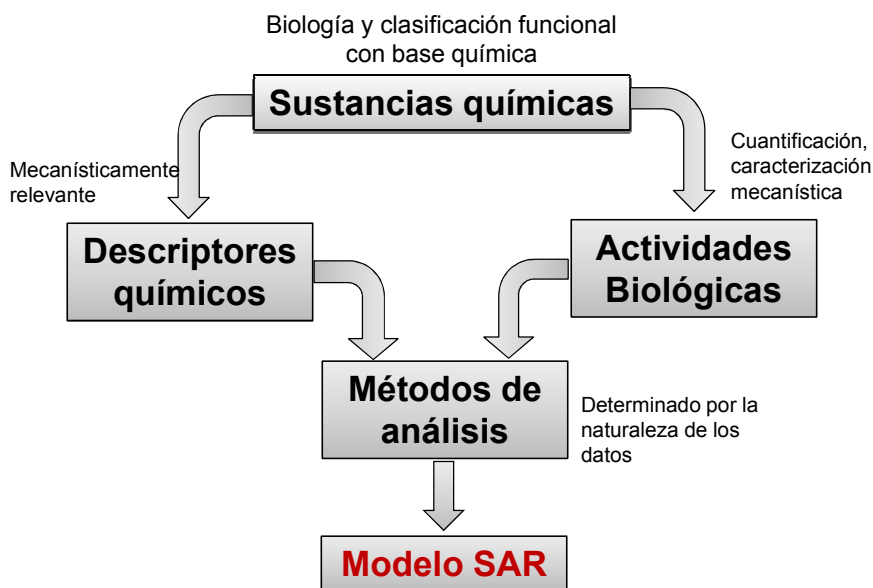


Fig. 5.8. Elementos importantes en el desarrollo de un modelo SAR con enfoque mecanicista [McKenney, *et al.*, 2000]

En primer lugar, es necesario considerar, que en la toxicidad influyen factores como el peso atómico o molecular, la valencia, la naturaleza química del compuesto y presencia de grupos funcionales en la molécula biológica (grupos toxóforos) que reaccionan con el tóxico, número de hidrógenos sustituidos en la moléculas, cadena de cloración en una molécula aromática, grupos amina y nitroso, insaturación posición de grupos funcionales, isomería geométrica, isomería óptica, estereoisometría (Tabla 5.3) [Hernández, *et al.*, 2011].

Tabla 5.3. Factores que influyen en la toxicidad de compuestos orgánicos e inorgánicos

CARACTERÍSTICA	OBSERVACIONES
Peso atómico o molecular	Tanto los compuestos orgánicos como los inorgánicos son más tóxicos cuanto mayor peso tienen
Valencia	Debido a que influye en solubilidad de las sales
Compuestos que actúan sobre grupos funcionales	Con frecuencia la toxicidad se debe a que un compuesto bloquea grupos funcionales de moléculas biológicas en la célula, p. ej., grupos aldehído, amino, sulfhidrilo, oligoelementos
Presencia en la naturaleza	En general la toxicidad de la sales de metales, es mayor cuanto más rara es su presencia en la naturaleza
Sustitución átomos de hidrógeno	La toxicidad de una sustancia orgánica aumenta al sustituir átomos de hidrógeno por halógenos; p. ej., los hidrocarburos aromáticos son sedantes y el nivel de efecto se incrementa con la halogenación, siempre que quede algún átomo de carbono sin sustituir
Cloración	La cloración de hidrocarburos aromáticos incrementa las propiedades antisépticas, debido a que la halogenación en una cadena lateral aumenta el poder irritante sobre mucosas
Grupos amina	El grupo NH ₂ es estimulante del sistema nervioso central y aumenta su toxicidad, además de que las aminas son metahemoglobizantes
Grupo nitroso	El grupo NO ₂ confiere propiedades vasodilatadoras, además de ser como el grupo amina metahemoglobizante. Los nitratos inorgánicos tienen potencial metahemoglobizante debido a que se reducen a nitritos en el intestino, en tanto que los orgánicos son vasodilatadores
Insaturación de compuestos orgánicos	La toxicidad aumenta con la insaturación, Así el CO, CNH, acroleínas, y moléculas semejantes son productos muy tóxicos. El grupo amino libre (R-NH ₂) es más tóxico que el sustituido (R-NH-R'). Su cualidad vasoconstrictora aumenta con la presencia de grupos -OH alcohólicos o fenólicos (adrenalina, oxifeniletilamina). El nitrógeno en forma -N= (piridina) es menos tóxico que en forma -NH ₂ (anilina) o H-N= (piperidina), por su actividad con los grupos aldehídos biológicos. El nitrógeno unido al núcleo aromático, o formando parte de él, disminuye la toxicidad sobre el sistema nervioso central, por lo que son analgésicos
Posición orto, meta o para	Los isómeros tienen diferente actividad
Isomería geométrica	Los compuestos simétricos suelen ser más tóxicos que los asimétricos
Isomería óptica	La actividad biológica corresponde a los levógiros, son menos activos los dextrógiros y los racémicos
Estereoisometría	Las formas estereoisómeras <i>cis</i> son más tóxicas que las <i>trans</i>

Fuente: Información tomada de las notas de Hernández, et al., 2011, del Curso de Toxicología Básica o Fundamental

Lo anterior significa que las estructuras químicas generalmente no contienen de forma explícita la información que se refiere a su actividad, de tal manera que dicha información tiene que ser extraída de la estructura, esto es de una serie de descriptores moleculares.

Los descriptores moleculares pueden ser considerados la información de mayor relevancia acerca de la composición de un compuesto químico. Varios descriptores moleculares racionalmente diseñados acentúan diferentes propiedades químicas implícitas en la estructura de la molécula. Sólo aquellas propiedades pueden correlacionar más directamente con la actividad. Esta gama de propiedades van de la fisicoquímica y química cuántica a las características geométricas y topológicas [Dudek, *et al.*, 2006].

Un esfuerzo considerable se ha centrado en explorar diferentes paradigmas y técnicas para generar rápidamente descriptores estructurales que, se espera, también codifiquen la actividad biológica. Con respecto a su aplicación prevista, los descriptores generados por computadora pueden dividirse en dos categorías separadas pero relacionadas: búsqueda en base de datos y aplicaciones de SAR [Tong, *et al.*, 2003]. La selección de descriptores no es trivial, hay descriptores que son genéricamente importantes en la capacidad que un compuesto químico tiene para aproximarse al sitio de acción, el ejemplo más claro de esto es el coeficiente de partición octanol-agua.

Otra manera de representar las moléculas, puede ir más allá de las estructuras de dos dimensiones, átomos y enlaces, a las basadas en estructuras tridimensionales, estéricas y campos electrostáticos, éstos últimos se consideran altamente adecuadas si se sabe o se sospecha que hay un mecanismo de actividad biológica mediado por receptor [Mckenney, *et al.*, 2006].

Con respecto al dominio de aplicabilidad de los modelos SAR y QSAR, éste se encuentra definido y limitado por la naturaleza y calidad de los datos utilizados en el desarrollo de modelos y es estrictamente aplicable sólo en relación con el conjunto de datos que se utilizó para generarlo, aunque posiblemente tenga capacidad predictiva dentro de ciertos límites fuera de ese conjunto de datos. Aun cuando mucho del desarrollo de estos modelos se debe a la industria, las aplicaciones de estos modelos se extienden a la academia y las agencias gubernamentales encargadas de la normatividad y políticas ambientales, Cronin [2009a], destaca las siguientes aplicaciones:

- Identificación racional de moléculas con potencial farmacológico, biocida o plaguicida
- Optimización de la actividad farmacológica, biocida o plaguicida

- Diseño racional de productos para la higiene y cuidado personal, tales como surfactantes, perfumes, colorantes y otros compuestos químicos
- Identificación de compuestos peligrosos en estadíos tempranos de desarrollo de un producto o para el tamizaje de compuestos existentes en inventarios
- Diseño de nuevos compuestos, asegurando que no son tóxicos o tienen efectos colaterales indeseable
- La predicción de la toxicidad a humanos, asociada con la exposición voluntaria, ocupacional y ocasional
- La predicción de la toxicidad para formas de vida silvestre
- Selección de compuestos con propiedades farmacocinéticas óptimas, en términos de su estabilidad o biodisponibilidad en los sistemas biológicos
- Predicción de propiedades fisicoquímicas de moléculas (si éstas son fármacos, plaguicidas, productos para el cuidado personal y otros compuestos químicos)
- Predicción de la transformación y destino de moléculas liberadas al ambiente
- Racionalización y predicción de efectos combinados de moléculas, si se encuentran en mezclas o formulación

En todos los casos, la clave del papel de las tecnologías *in silico* es que las predilecciones pueden obtenerse a partir de las características de las moléculas

En la evaluación de un modelo, es importante definir los límites o fronteras de aplicación, teniendo en cuenta qué tipo de moléculas y rango de valores del descriptor, tener actividades que puedan ser predichas con confiabilidad y, medidas estadísticamente significativas de ajuste y robustez. Los modelos también pueden llevar a hipótesis mecanicistas para guiar futuras pruebas y validación. Un proceso de validación del modelo debe probar la capacidad predictiva, así como explorar los límites de su aplicación y probar las hipótesis mecanicistas sugeridas por un modelo bien construido.

En investigación, la utilidad de los modelos SAR va más allá de la predicción, ya que pueden ofrecer una racionalización de las variaciones de actividad en datos existentes, justificar un mecanismo común de actividad (y aditividad del efecto) para una serie de compuestos químicos, identificar desviaciones debidas a cualquier error experimental o mecanismos alternativos, servir como medida de comparación para

En síntesis, un compuesto químico puede ser caracterizado a tres diferentes niveles: 1) estructura molecular (S); 2) por sus propiedades fisicoquímicas (P) y, por su actividad biológica (A). La estructura molecular puede ser representada por una serie de descriptores, en tanto que las fisicoquímicas pueden ser resultado de métodos experimentales, o calculadas mediante métodos computacionales. La respuesta biológica, puede obtenerse mediante técnicas de ensayo diversas [Tong, *et al.*, 2003], *in vivo* e *in vitro*.

Por último, son necesarios métodos apropiados de análisis para relacionar las actividades y estructuras químicas de interés, que dependerán de la naturaleza de la medición de la actividad (por ejemplo, cualitativa y cuantitativa) y el nivel de entendimiento del mecanismo químico de acción (por ejemplo, mediada por receptor), etc. El objetivo es procurar en cada paso del proceso, verificar o evaluar lo que es químicamente y biológicamente plausible, para limitar razonablemente el problema en estos términos, y para derivar modelos fundamento científico sólido y bases para su interpretación [Mckenney, *et al.*, 2006].

5.3.2.2 Métodos

Todo tipo de modelos predictivos dependen de los datos en cuales estén basados, la técnica para desarrollar el modelo y la calidad de la información que alimenta a dicho modelo. Los modelos *in silico* para la predicción de las propiedades y los efectos de las moléculas no son diferentes.

En casi todos los casos, dos tipos de información son necesarios para un modelo (el efecto a ser modelado y descriptores de los productos químicos) y una(s) técnica(s) para formular las relaciones. Los datos a ser modelados corresponden a la variable independiente o respuesta matriz X y los descriptores o variables explicativas en la matriz Y , (Fig. 5.9), de tal matriz, es posible obtener varios tipos de relaciones si los datos se tratan mediante métodos estadísticos u otros [Cronin, 2009a]. Si se trata de un QSAR, la respuesta biológica es una variable continua en función de uno o más descriptores, en tanto que si se trata de un modelo SAR, la variable respuesta es categórica ausencia/presencia de respuesta, tóxico/no tóxico; también es posible establecer relaciones semicuantitativas, pero en todos los casos, las bases deberán ser firmes en calidad y confiabilidad.

Los estudios de correlaciones entre propiedades físicas y propiedades químicas o biológicas, requieren disponer de datos biológicos de calidad, definir descriptores químicos relevantes y elegir un modelo adecuado para investigar las posibles relaciones (Fig. 5.10); esto es, en el desarrollo de un QSAR, se requiere un número significativo de moléculas o compuestos para obtener una relación significativa, Cronin [2009a], plantea que diversos autores estiman que para cada descriptor se requieren entre cinco y diez compuestos, lo cual lleva al uso de

métodos basados en regresión, para poder analizar los datos y establecer correlaciones [Selassie, 2003].

Fig. 5.9. Matriz de datos típica para un estudio QSAR [Cronin, 2009a]

Identificador químico	Actividad a ser modelada	Propiedad/ Descriptor/ Fragmento 1	Propiedad/ Descriptor/ Fragmento 2	Propiedad/ Descriptor/ Fragmento 3	...	Propiedad/ Descriptor/ Fragmento n
Molécula i	X_i	Y_{1i}	Y_{2i}	Y_{3i}	...	Y_{ni}
Molécula ii	X_{ii}	Y_{1ii}	Y_{2ii}	Y_{3ii}	...	Y_{nii}
Molécula iii	X_{iii}	Y_{1iii}	Y_{2iii}	Y_{3iii}	...	Y_{niii}
...	
Molécula n	X_n	Y_{1n}	Y_{2n}	Y_{3n}	...	Y_{nn}

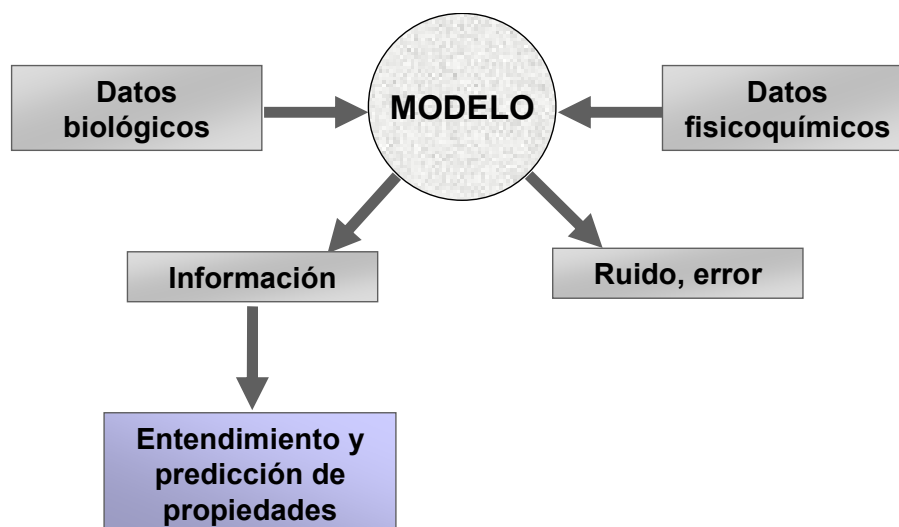


Fig. 5.10. Descriptores del modelo y resultados esperados
Tomado de: http://www.qo.fcen.uba.ar/Cursos/quimed_files/QM09-7.pdf

Asimismo, como puede deducirse de la Fig. 5.10, la información que se integra a un QSAR es variada, como se presenta en la Tabla 5.4 tomada de Cronin [2009a], sin que el autor considere que es exhaustiva.

La gama de aproximaciones de modelación también es variada así como el grado o nivel de complejidad: análisis de Hansch, Free-Wilson, fragmentos y alertas estructurales, formación de categorías,

Tabla 5.4. Tipos de información incluida en las aproximaciones de modelación *in silico*

DATOS A SER MODELADOS
<ul style="list-style-type: none"> • Efectos farmacológicos • Efectos toxicológicos • Propiedades fisicoquímicas • Propiedades farmacocinéticas que gobiernan la biodisponibilidad • Transformación ambiental
QUÍMICA
<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades fisicoquímicas • Propiedades estructurales bidimensionales (2-D) y tridimensionales (3-D) • Presencia, ausencia y número de átomos, fragmentos y subestructuras • Química cuántica y computacional
MODELACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> • Formación de categorías de moléculas similares • Estadística • QSAR 3D/4D
OTROS ASPECTOS
<ul style="list-style-type: none"> • Calidad y confiabilidad de los datos • Formatos del reporte del modelo y predicción • Dominio de aplicabilidad • Robustez del modelo y validación de una predicción

Fuente: Tomada de Cronin, 2009a

Históricamente, la relaciones estructura actividad, datan del siglo XI, en la actualidad, se consideran como punto toral, los métodos para correlacionar cuantitativamente características estructurales con actividad biológica introducidos por Hansch, Hansch y Fujita en la década de 1960 [Selassie, 2003], con la finalidad de predecir para un compuesto nuevo si éste es activo o inactivo biológicamente, si es selectivo, si provee información nueva, propiedades farmacocinéticas (ADME: absorción, distribución, metabolismo, excreción) y toxicidad.

Pueden usarse datos biológicos y bioquímicos desde muy precisos (KD) hasta muy aproximados (activo/inactivo, antagonista/agonista, etcétera). Los datos estructurales pueden tomarse a distintos niveles, desde propiedades intrínsecas de la molécula no relacionadas a las interacciones hasta descripciones estéricas-electrónicas como el potencial electrostático mapeado sobre la superficie de Van der Waals.

Los descriptores químicos utilizados pueden tener información global (estructural) de la molécula o local para partes de la molécula (subestructuras) Las propiedades utilizadas pueden ser experimentales, calculadas o una combinación de ambas.

Las técnicas matemáticas más frecuentemente utilizadas se basan en el análisis de regresión; aunque también se utilizan técnicas de análisis como: factorial, componentes principales, cluster, reconocimiento de patrones, de discriminantes, redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés) y técnicas cibernéticas como máquinas de autoaprendizaje, algoritmos genéticos, entre otros métodos matemáticos y estadísticos. Independientemente del método de análisis que se utilice, el modelo debe ser evaluado, obteniendo como mínimo los parámetros estadísticos que describen la ecuación, el coeficiente de correlación y su significancia estadística.

5.3.2.3 Descriptores

Se fundamenta, como ya se anotó, en el planteamiento de una ecuación matemática en la cual la actividad biológica, efecto adverso o respuesta tóxica está regida por parámetros moleculares tales como hidrofobicidad (p., ej., LogP o coeficiente de partición), factores estéricos (E_s) y arreglo espacial, y otras propiedades complejas como es el caso de la refractividad molar (MR), entre otras listadas en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Descriptores moleculares (propiedades fisicoquímicas) que rigen la magnitud del efecto adverso o toxicidad

DESCRIPTORES MOLECULARES	
Hidrofobicidad	
<ul style="list-style-type: none"> Logaritmo₁₀ del coeficiente de partición octanol-agua ($\log P_{ow}$) Coeficiente de partición entre dos fases inmiscibles (agua-gas) Constante de Hansch, sustituyendo a la constante hidrofóbica π 	<ul style="list-style-type: none"> Solubilidad Constantes derivadas de datos cromatográficos Presión de vapor de saturación sobre un compuesto líquido Constante fragmental de Rekker
Constantes electrónicas (constantes de reactividad)	
<ul style="list-style-type: none"> Constante de Hammett σ y sus modificaciones 	<ul style="list-style-type: none"> Constantes de ionización Momento dipolo
<ul style="list-style-type: none"> Constante inductiva Swain-Lupton Constante de resonancia Swain-Lupton 	<ul style="list-style-type: none"> Constante de Taft para compuestos polares o para compuestos alifáticos
Índices Cuánticos	
<ul style="list-style-type: none"> Densidad electrónica en el átomo Superdeslocalización nucleofílica Superdeslocalización electrofílica 	<ul style="list-style-type: none"> Orbital molecular de mayor energía que se encuentra ocupado Orbital molecular de menor energía que se encuentra desocupado
Estericidad y arreglo espacial	
<ul style="list-style-type: none"> Constante estérica de Taft sustituyendo a la constante E_s Peso molecular relativo Índice topológico de conectividad molecular 	<ul style="list-style-type: none"> Radio de un sustituyente van der Waals Volumen molecular Superficie molecular Volumen molar (peso molecular relativo/densidad)

DESCRIPTORES MOLECULARES

Propiedades estructurales

- Presencia de subestructuras o grupos funcionales (sustituyentes en orto de un centro de reacción, sustituyentes contiguos o grupos formadores de puentes de hidrógeno)
- Frecuencia con la cual están presentes

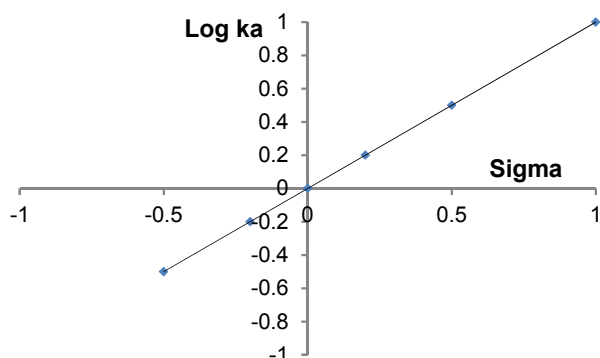
Descriptores electrónicos

En la década de 1930, Hammett, introdujo el concepto “*sigma-rho*”, y junto con Taft, proveen las bases para mecanicistas para el desarrollo del paradigma QSAR de Hansch y Fujita [Selassie, 2003].

Hammett plantea que los efectos electrónicos de un conjunto de sustituyentes en diferentes reacciones orgánicas son iguales. Si esos efectos pueden evaluarse en una reacción estándar, entonces se podrán usar en cualquier reacción. El parámetro electrónico de sustituyente σ se determinó con base en las constantes de disociación de ácidos benzoicos sustituidos:

$$\rho\sigma = \log K_x - \log K_h$$

- K_H, K_X : constantes de ionización de ácido benzoico y de ácidos benzoicos sustituidos en posición *para* o *meta*; ρ depende de las condiciones de reacción, $\rho = 1$ en agua a 25°C



Como se ilustra en la Fig. 5.11

- $\sigma=0$ para H
- $\sigma>0$ para sustituyentes electrofílicos (CN, NO₂, CF₃)
- $\sigma<0$ para sustituyentes donadores de electrones (NH₂, CH₃)

Fig. 5.11. Representación de la constante de Hemmett

- ρ grande indica que la reacción es muy sensible a efectos de sustituyentes
- $\rho > 0$ la reacción se favorece por sustituyentes electrofílicos
- $\rho < 0$ la reacción se favorece por sustituyentes donadores de electrones

Las constantes σ *meta* (inductivo) y *para* (inductivo + resonancia) de un sustituyente en general no son iguales, pueden expresarse como una combinación lineal de un efecto de resonancia (R) y uno de campo (F) independientes de la posición del sustituyente

$$\sigma = f F + r R \text{ (f y r son factores de peso)}$$

Descriptores de hidrofobicidad (lipofilicidad)

De los descriptores de hidrofobicidad, el más ampliamente utilizado para los modelos QSAR y el más conocido el coeficiente de reparto o coeficiente de partición octanol-agua, esto es, la razón de concentraciones de una especie química única entre dos fases líquidas inmiscibles en equilibrio:

$$P_{ow} = (C_{n-oc\ tan\ ol} / C_{agua})$$

En forma análoga a la ecuación de Hammett, es posible describir la constante de lipofilicidad de sustituyentes en la molécula en cuestión:

$$\pi = \log P_X - \log P_H$$

- P_X y P_H son los coeficientes de partición entre un solvente orgánico y agua de un compuesto y su derivado sustituido con X.
- $\pi > 0$ carácter lipofílico respecto del hidrógeno
- $\pi < 0$ carácter hidrofílico respecto del hidrógeno
- En la determinación de coeficientes de partición debe tenerse en cuenta la ionización del compuesto en la fase acuosa
- El sistema 1-octanol/agua se usa como referencia. Una membrana según sus características específicas puede ser modelada por otros solventes:
 - Inerte → Alcano
 - Anfiprótica → 1-octanol
 - Donador de protones → Cloroformo
 - Aceptor de protones → Dipelargonato de propilenglicol

Así, la constante π depende del entorno molecular, y es aditiva y constitutiva; por efecto inductivo, los grupos electrofílicos conllevan un incremento en π cuando hay puentes de

hidrógeno; los efectos de resonancia en sistemas aromáticos, disminuyen la capacidad de formar puentes de hidrógeno por deslocalización de los pares de electrones libres, lo que resulta también en un incremento de π . Los efectos conformacionales también pueden afectar la lipofiliidad o hidrofobicidad.

Estericidad

Los efectos estéricos son variables, si un grupo interfiere con el acceso a pares de electrones libres que pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, π aumenta, pero el agrupamiento de grupos hidrofóbicos tendrá el efecto opuesto. Selassie [2003], describe la importancia de dichos efectos en el análisis QSAR, como se presenta a continuación:

a) Los efectos estéricos pueden describirse mediante el parámetro E_S de Taft. La ecuación de Taft, establece la relación de las reactividades de ésteres alifáticos con la constante de polaridad δ^* y la constante estérica E_S de la forma [http://www.edilatex.com/index_archivos/quimicafisica.pdf]:

$$\log k = \log k_0 + \rho^* \sigma^* + \delta E_S$$

b) El parámetro E_S , deriva de la hidrólisis ácida de ésteres $X-CH_2-COOR$ y CH_3-COOR , k_X y k_H respectivamente:

$$E_S = \log (k_X / k_H)_A$$

c) Generalmente $E_S=0$ para $X=CH_3$; la negatividad de E_S directamente proporcional al volumen de X.

d) Hancock, introdujo una constante 0.306, obtenida mediante cálculo del orbital molecular para corregir el problema que se presenta de hiperconjugación de un número n de α -hidrógenos en el grupo funcional acetato de la molécula:

$$E_S^C = E_S + 0.306(n - 3)$$

e) A diferencia de otros descriptores, los valores de E_S y E_S^C , están limitados para un gran número de compuestos orgánicos, lo que restringe su uso en los estudios QSAR. Charton solucionó esto al demostrar que E_S se correlaciona fuertemente con el radio mínimo van der

Walls del sustituyente e hidrógeno, r_X y r_H respectivamente, lo que permite el desarrollo del parámetro upsilon:

$$u_X = r_X - r_H = r_X - 1.2$$

La refractividad molar (MR), directamente relacionado con el volumen molar (PM/δ) es uno de los parámetros estéricos más ampliamente utilizados. La ecuación de Lorentz-Lorenz, describe esta relación, a partir del peso molecular PM , el índice de refracción n y la densidad δ :

$$MR = [n^2 - 1] / (n^2 + 2) (PM / \delta)$$

MR es una propiedad aditiva de la molécula a mayor MR mayor es el volumen estérico del sustituyente y mayor su tendencia a interactuar a través de fuerzas de London. Este parámetro también mide el efecto electrónico y puede reflejar interacciones dipolo-dipolo en el sitio receptor no distingue forma, por ejemplo el valor MR para $(-CH_2CH_2-CH_2-CH_2-CH_3)$ es el mismo que para $[-C(Et)(CH_3)_2]$, 2.42. La interpretación no es sencilla, no obstante, MR es una propiedad aditiva, a mayor MR mayor es el volumen estérico del sustituyente y mayor su tendencia a interactuar a través de fuerzas de London. Este parámetro también mide el efecto electrónico y puede reflejar interacciones dipolo-dipolo en el sitio receptor.

En modelos QSAR biológicos, este parámetro se aplica cuando los efectos intermoleculares son relevantes; p. ej., en sistemas celulares e incluso distribución/transporte en donde los procesos de difusión son el modo de operar. Con sustituyentes alquilo, hay un alto grado de colinealidad con la hidrofobicidad; de aquí, que se debe ser muy cuidadoso en el análisis de la relación cuantitativa estructura-actividad.

Descriptores biológicos

En QSAR, es necesario que los datos biológicos sean preciso y exactos, para desarrollar un modelo significativo, esto es un modelo QSAR es válido estadísticamente sólo si los datos tienen calidad para su desarrollo. Los datos biológicos usualmente se expresan en escala logarítmica, debido a la naturaleza de la curva dosis respuesta, esto es una relación lineal entre la respuesta con el log de la dosis en la región media de la curva log dosis-respuesta. El inverso del logaritmo de actividad ($\log 1/C$) se utiliza para obtener análogos más efectivos para valores más altos. Algunos de los datos biológicos más utilizados en la modelación QSAR se listan a continuación (Tabla 5.6):

Tabla 5.6. Tipos de datos biológicos utilizados en el análisis QSAR

ACTIVIDAD	PARÁMETRO BIOLÓGICO
Receptores aislados	
Constantes de velocidad	Log k_{cat} , logk
Constante de Michaelis-Menten	Log $1/K_m$
Constante de inhibición	Log $1/K_i$
Datos de afinidad	pA_2 , pA_1
Sistemas celulares	
Constantes de inhibición	Log $1/C_{50}$
Resistencia cruzada	Log CR
Datos biológicos in vitro	Log $1/C$
Estados de mutagenicidad	Log TA_{98}
Sistemas in vivo	
Factor de bioconcentración	Log BCF
Tasad de reacción in vivo	Log I (inducción)
Tasas farmacodinámicas	Log T (depuración total)

Fuente: tomada de Selassie, 2003

5.3.2.4 Análisis de Hansch y Fujita

Este análisis, introducido en 1963 por Hansch y Fujita (Fig. 5.12), es más utilizado como método alternativo *in silico*, para la predicción de la toxicidad. Los descriptores incluidos en el modelo pueden obtenerse de tablas, bases de datos o pueden ser calculados mediante software en computadora.



Fig. 5.12. Esquematización de un análisis QSAR de acuerdo con Hansch y Fujita
Tomado de: http://www.qo.fcen.uba.ar/Cursos/quimed_files/QM09-7.pdf

La forma parabólica de la de ecuación de Hansch hace posible estimar la hidrofobicidad de una molécula para obtener el efecto deseado. Consiste en la modelación o análisis de las posibles relaciones que existen entre las propiedades biológicas y fisicoquímicas, químicas o físicas, de una serie de compuestos químicos ajenos a un organismo vivo (xenobiótico). Tal análisis se lleva a cabo mediante métodos estadísticos y de acuerdo con Tichý [2005], quien hizo una revisión de la aplicación de métodos *in silico*, la fórmula matemática general para derivar las propiedades biológicas es la siguiente:

$$B_i = f(X_i)$$

En donde BA_i es una actividad biológica (magnitud de un efecto adverso o tóxico) de un compuesto i ; X_i es la propiedad conectada o asociada con la estructura química del compuesto i ; f es una función matemática derivada para una cierta serie de compuestos.

Hansch y Fujita en 1963, lo expresaron como el la respuesta biológica (RB) asociada con los parámetros descriptores químicos (correlación lineal de energía) de una serie de análogos en función de ciertos factores definidos (lipofilicidad, electrónicos y de estericidad):

$$RB=f(\text{descriptores moleculares o de fragmentos})$$

A partir de esta ecuación, como sea que se exprese, con base en ensayos de toxicidad diversos y conociendo el valor de la propiedad fisicoquímica X_i (i es el compuesto no probado perteneciente a una serie de compuestos), es posible estimar o calcular valores de toxicidad, para uno o más compuestos.

La ecuación básica de Hansch, considerando que generalmente se obtienen relaciones parabólicas entre los coeficientes de partición o la lipofilicidad y la actividad biológica, para una serie homóloga de compuestos; integra variables como la concentración C y otras constantes k que resultan del análisis de regresión:

$$\log(1/C) = -k(\log P)^2 + k'(\log P) + k''$$

El tipo de respuesta (concentración efectiva 50, dosis letal 50, p. ej.) se obtiene de la inversa de la concentración C , mayor potencia está asociada con una dosis menor, se considera que el óptimo es $\log P_0 = k'/2k$. Esta ecuación se expandió e incorporó los efectos electrónicos a través

del σ Hammett, así como los estéricos (E_S), estos es, cubre las tres propiedades de un compuesto que rigen o gobiernan la respuesta biológica asociada:

$$-\log C = k_1(\log P_{ow})^2 + k_2 \log P_{ow} + k_3 \sigma + k_4 E_S + k_5 \quad -\log C = k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 E_S + k_4 \sigma + k_5$$

Posteriormente, se incorporó también la forma (S). Siempre se busca el mejor ajuste mediante mínimos cuadrados de la variable de efecto (respuesta biológica) asociada con una combinación lineal de las variables explicativas (descriptores):

$$\log (1 / C) = -a\pi^2 + b\pi + c\sigma + dE_S + e$$

Para autores como Tichý [2005], el log de P_{ow} es suficiente y representa un peso y significancia altas como variable explicativa, de tal manera que las otras variables o descriptores, tienen un peso menor. En cualquier caso, para evaluar la predicción, es necesario calcular el peso y significancia de cada uno de los descriptores.

Es importante señalar que deben cumplirse los supuestos para una regresión lineal así como los siguientes puntos:

- La relación de compuestos a descriptores deber >5
- Los descriptores no deben estar correlacionados (coeficientes de correlación <0.5)
- Se prueban ecuaciones con distintas combinaciones de parámetros una vez seleccionada la mejor que sea estadísticamente significativa, puede usarse para predecir la actividad de compuestos no ensayados
- Cuando hay más variables (características estructurales) que compuestos o se deben correlacionar varias actividades biológicas simultáneamente, entonces:
 - Se requieren métodos de regresión más robustos que la regresión lineal múltiple
 - Se utilizan métodos de reconocimiento de tendencias como proyecciones parciales de cuadrados mínimos o análisis de componentes principales
 - Estos métodos reducen la descripción original de cada molécula en un número pequeño de dimensiones descriptivas llamadas componentes principales que son combinaciones lineales de las variables originales
 - Esto tolera entre otras cosas que el conjunto de descriptores químicos esté incompleto (datos faltantes para algunos compuestos)

Algunos ejemplos de aplicaciones obtenidas mediante análisis Hansch, fueron analizados por Font [s/f, www.unav.es/organica/docencia/computacional_q/QSAR/QSAR.pdf]:

- Unión de hidrocarburos aromáticos a la seroalbúmina

$$\log K = 0.045MR + 2.552$$

- Actividad anticolinérgica de derivados morfólinicos

$$\log A = -0.496p^2 + 3.964p - 1.285$$

- Inhibición de la acetilcolinesterasa por arilcarbamatos ortosustituídos

$$\log A = 3.48Es + 2.80p + 4.25s + 2.54$$

- Actividad bacteriostática de sulfonamidas frente a *Escherichia coli*

$$\log A = 0.67s - + 0.48 s - 0.15p + 4.80$$

Las limitaciones del método pueden sintetizarse como sigue:

- Al no saber que átomos interactúan con el receptor puede ocurrir que algunos efectos estéricos no sean importantes (como ya mencionaba Tichý)
- Las reacciones usadas para derivar los descriptores generalmente se generan en matrices ácidas o básicas, donde los compuestos están totalmente ionizados, en tanto que en el medio biológico las moléculas suelen estar parcialmente protonadas
- No aplican al descubrimiento de nuevos compuestos, sino a la comparación de un nuevo compuesto con otros conocidos, esto es empírico y retrospectivo
- Como en otros métodos empíricos las extrapolaciones generalmente fallan, de aquí la importancia de tener un modelo para el cual se ha evaluado el peso y la significancia de cada uno de los descriptores

5.3.2.5 Método de Nys y Rekker

Este análisis se apoya en el concepto de aditividad, asumiendo que todas las subestructuras de un compuesto bioactivo contribuyen de modo aditivo, es la suma de la hidrofobicidad de los fragmentos del compuesto en cuestión [Costa, 2004]. Así, considerando esto, Rekker observó que la aplicación del parámetro de Hansch en sistemas que contienen cadenas alifáticas falla en el principio de aditividad, por lo que el autor consideró la contribución de grupos

sustituyentes individuales en la hidrofobicidad o lipofilicidad de la molécula y definió el parámetro f , mediante la siguiente ecuación:

$$\log P = \sum af$$

Siendo P el coeficiente de partición del compuesto; f es la constante hidrófoba de la molécula, es la contribución individual de cada subestructura del compuesto; y a la frecuencia con la cual un fragmento dado se encuentra en la estructura de la molécula.

Al introducir un factor de corrección para el análisis, resulta la siguiente ecuación:

$$\log P = \sum F = \sum_{i=1}^n a_i \cdot f + \sum_{i=1}^m k_i \cdot C_m$$

f = constante hidrófoba de un fragmento

a = número de estos fragmentos presentes en la molécula

C_m = factor de corrección, cuyo valor es 0.219

K_i = frecuencia del factor de corrección

El factor C_m considera:

- Efecto de proximidad ó descripción de la presencia de centros negativos separados por uno ó dos carbonos $[X-(CH_2)_n-X]$
- Tipo de soporte hidrocarbonado (alifático saturado acíclico, cíclico, insaturado, conjugado, aromático, aromático condensado conjugado)
- Presencia de átomos de hidrógeno unido a grupos electronegativos
- Presencia de grupo electronegativo junto a grupo alquilo voluminoso
- Presencia de un átomo de oxígeno unido a un anillo aromático por un átomo de carbono.
- Existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares
- Aspectos conformacionales
- Presencia, en compuestos aromáticos, de grupos neutros situados en orto con respecto a un sustituyente capaz de interactuar por resonancia
- Combinación de dos grupos capaces de interactuar entre sí por resonancia

5.3.2.6 Modelos Free-Wilson o *de novo*

El trabajo de Free y sus colaboradores, se llevó a cabo en paralelo a los trabajos del grupo de Hansch. En 1964, Free y Wilson postularon que para una serie de compuestos similares, diferentes entre sí, apenas por la presencia de ciertos sustituyentes, la contribución de estos sustituyentes para la actividad biológica es aditiva y depende sólo de dos tipos de posición de dicho sustituyente. Un modelo Free-Wilson, no puede ser aplicado a moléculas cuyos sustituyentes no son combinaciones lineales; no obstante una ventaja es que permite la optimización de sustituyentes para un tipo de estructura base.

Supone que la introducción de un sustituyente en una dada posición en una molécula, cambia la potencia siempre en la misma magnitud independientemente de los otros sustituyentes presentes. La actividad biológica se representa como $AB = \log A/A_0$ (A y A_0 son las actividades del compuesto sustituido y sin sustituir; $X_i = 1$ si el sustituyente i está presente y 0 si no lo está; a_i es la contribución del sustituyente i a la actividad respecto de H ; p_μ es la actividad global del esqueleto sin sustituir

$$AB = \sum a_i + X_i + \mu$$

De acuerdo con Pastor y Álvarez [s/f], este modelo se considera el único modelo auténtico SAR, ya que la contribución a la actividad cada una de las fracciones o fragmentos de la molécula se calcula directamente por regresión múltiple. En la aproximación extratermodinámica se correlacionan propiedades fisicoquímicas con actividad y no fragmentos estructurales. Los mismos autores, anotan que la utilidad del análisis Free-Wilson es más limitada que la de los modelos extratermodinámicos los cuales generan información acerca de la acción de un compuesto a nivel molecular, en tanto que los modelos *de novo* permiten sólo una cuantificación de los efectos que los cambios estructurales producen sobre la actividad biológica. Las limitaciones de estos modelos pueden ser sintetizadas como sigue:

- En muchos casos hay un número muy grande de parámetros lo cual impide el uso de regresión lineal múltiple (pueden aplicarse métodos de reconocimiento de tendencias)
- El método es estrictamente por interpolación
- Todos los sustituyentes y características estructurales son considerados con la misma disimilitud (la diferencia entre metilo y etilo equivale *a priori* a la diferencia entre metilo y amino, etcétera)

- No da ideas de las razones fisicoquímicas por las que alguna característica estructural puede ser favorable o desfavorable

5.3.2.7 Métodos semicuantitativos

Los métodos semicuantitativos, incluyen a un grupo diverso de análisis de información que puede ser obtenida de diferentes fuentes y bases de datos: Craig, Topliss, Fibonacci, Simples, Austel y conglomerados de Hansch. Estos son métodos manuales, no matemáticos y no estadísticos, basados en los principios del análisis de Hansch. Asimismo, están basados en los descriptores σ y π y en menor medida en E_s . El gráfico de Craig representa dos descriptores seleccionados, como por ejemplo σ vs π para distintos sustituyentes, la Fig. 5.13 representa un gráfico de este tipo:

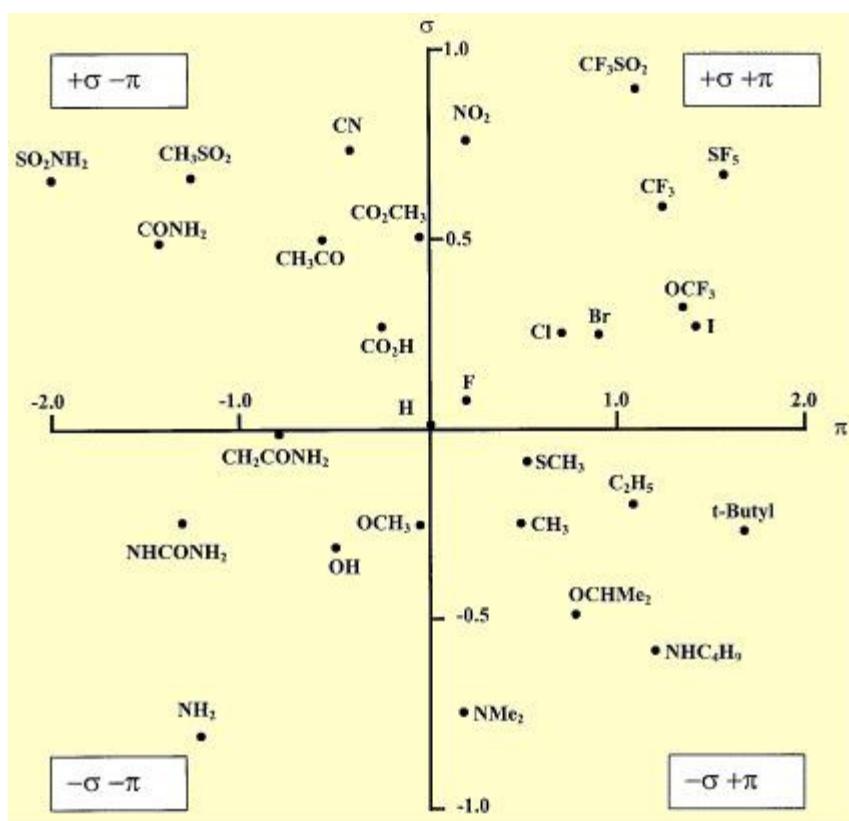


Fig. 5.13. Plot de Craig

Fuente: <http://hydra.vcp.monash.edu.au/modules/mod4/qsarwebp7.html>

El signo y magnitud de los coeficientes de σ y π (de la ecuación de Hansch) determina el cuadrante del gráfico a usar en las síntesis de nuevos análogos. También se pueden seleccionar sustituyentes de distintos cuadrantes de modo de cubrir un amplio rango de propiedades: lipofílico e hidrofílico, electrofílicos y donadores d electrones.

El método de Topliss sigue un esquema intuitivo basado en un árbol de decisión El pre-requisito es que el compuesto líder debe tener un anillo bencénico no fusionado Partiendo de un compuesto bencénico no sustituido. Font [s/f], ejemplifica lo siguiente para la construcción de un árbol de decisión (Fig. 5.14):

- Como el aumento en lipoficidad generalmente aumenta la potencia, el primer análogo debe ser uno, con un sustituyente con $\pi > 0$. p. ej., 4-cloro tiene $\pi = 0.71$ y $\sigma = 0.23$ es una buena elección inicial.
- Si la potencia aumenta, puede deberse al mayor π , al mayor σ o a ambos entonces el siguiente paso es poner un cloro en meta.
- Si el 3,4-dicloro ($\pi = 1.25$ y $\sigma = 0.52$) es más activo puede discriminarse entre efecto σ y π con el sustituyente S-Ph en para ($\pi = 2.32$ y $\sigma = 0.18$) o el 3-trifluorometil-4-nitro ($\pi = 0.60$ y $\sigma = 1.21$)

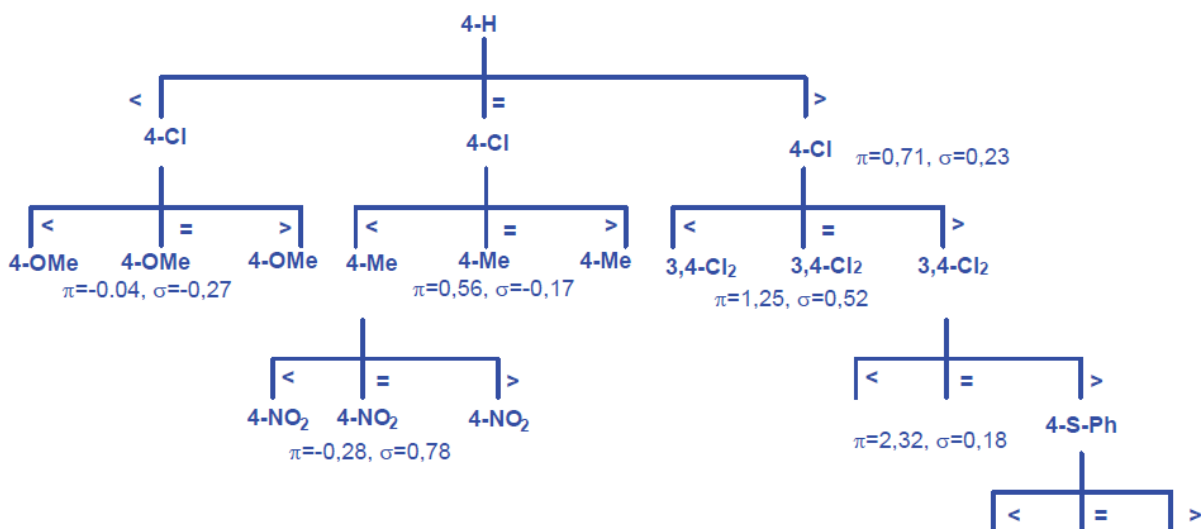


Fig. 5.14. Ejemplo de un árbol de decisión Topliss, para un compuesto organoclorado

Topliss extendió el esquema a cadenas laterales cuando el grupo es adyacente a carbonilo, amino o amida y puede aplicarse a otras situaciones que no impliquen sustitución directa sobre el anillo aromático. El principal inconveniente del método de Topliss así implementado es que

es secuencial. Una extensión no manual introducida por Hansch agrupa en clusters los sustituyentes con propiedades similares según σ , π , π^2 , ES , F , R , MR y PM [Font, s/f].

5.3.2.8 Metodologías QSAR 3D

Estos métodos sólo son aplicables a datos de actividad *in vitro*, razón por la que no se hace un análisis detallado de estas metodologías en el presente estudio. Estas metodologías cubren el hecho de que en el análisis de Hansch y en los métodos de reconocimiento de tendencias, usualmente no toman en cuenta la estructura tridimensional de los compuestos de una manera explícita.

Las metodologías que tienen en cuenta explícitamente la geometría 3D se denominan QSAR-3D y los dos métodos más usados son:

- a) CoMFA: Comparative Molecular Field Análisis, que consiste en un mapa 3D de interacciones electrostáticas y estéricas de los ligandos en estudio que luego se correlacionan con la actividad biológica
- b) CoMSIA: Comparative Molecular Similarity Index, este análisis calcula índices de similitud para un conjunto de moléculas previamente alineadas con respecto a propiedades fisicoquímicas (interacciones de distintos tipos, puentes H, etcétera). Esos índices luego se correlacionan con la actividad biológica

CoMFA incluye las siguientes etapas:

- a) Identificación de la conformación activa
- b) Regla de alineación (crítico cuando se utilizan estructuras muy distintas)
- c) Construcción de una grilla 3D (puntos separados 1-2 Å)
- d) Cálculo de las interacciones de Van der Waals y electrostáticas en cada punto respecto de un átomo de prueba sp^3 con carga +1 (los campos)
- e) Selección de un grupo de entrenamiento o calibración
- f) Análisis por el método de cuadrados mínimos parciales
- g) Validación cruzada con un grupo de compuestos no usados
- h) Los juegos de coeficientes para los campos de Van der Waals y electrostáticos se representan como mapas de contorno

CoMSIA parte de un conjunto prealineado y busca similitudes con distintos campos. Generalmente se utilizan interacciones electrostáticas, estéricas, hidrofóbicas, aceptoras de puente H y donadoras de puente H. Incluye las siguientes etapas:

- a) Identificación de la conformación activa
- b) Regla de alineación (crítico cuando se utilizan estructuras muy distintas)
- c) Construcción de una grilla 3D (puntos separados 1-2 Å)
- d) A diferencia de CoMFA evalúa la similitud en la respuesta a una sonda determinada para el conjunto de moléculas
- e) La sonda puede evaluar cualquier propiedad fisicoquímica pero generalmente se utilizan interacciones electrostáticas, estéricas, hidrofóbicas, aceptoras de puente de H y donadoras de puente H
- f) Selección de un grupo de entrenamiento o calibración
- g) Análisis por el método de cuadrados mínimos parciales
- h) Validación cruzada con un grupo de compuestos no usados
- i) Los juegos de coeficientes para los campos evaluados se representan como mapas de contorno

Los modelos pueden predecir en el espacio 3D cubierto por las estructuras de calibración, pero si una posición sólo tiene metilo y etilo no se puede predecir el efecto de alquilos mayores. Las ventajas de QSAR-3D, pueden sintetizarse como sigue:

- El mismo protocolo puede ser aplicado a distintos problemas
- El método puede manejar grupos de compuestos estructuralmente distintos y predecir nuevos compuestos con características que no existían en el conjunto de calibración
- Los mapas de contorno tienen relación directa con las interacciones importantes tóxico-receptor si se conoce la estructura del receptor y las estructuras se alinean ubicándolas en el sitio activo, los mapas de contorno resultantes coincidirán con los aminoácidos del receptor importantes para la unión y proveerán información sobre cuales son las interacciones principales

5.3.3 TOXICOCINÉTICA, METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS Y ALERTAS ESTRUCTURALES

La primera condición para que un xenobiótico o agente extraño interactúe con un organismo, es que el agente transgreda las barreras del organismo e ingrese a éste (excepto para los compuestos químicos tópicos que son irritantes al contacto con la piel). Esto significa que son los procesos de absorción los que gobiernan la transferencia de cualquier compuesto del ambiente externo al ambiente interno.

Para que un tóxico ambiental cause un daño, en primer lugar se debe estar expuesto a él y en segundo lugar el tóxico tiene que vencer las defensas del organismo que tratan de impedirle que llegue al tejido blanco en forma activa. Las defensas consisten fundamentalmente en mecanismos que restringen la movilidad y disminuyen el período de exposición del tejido blanco. Esto lo puede hacer el organismo poniendo barreras a su desplazamiento hacia determinados tejidos, disminuyendo su difusibilidad a través de las membranas celulares y/o facilitando su excreción. El proceso de transporte y transformaciones que experimenta el tóxico desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos en los que se almacenan y en los que causa lesiones es muy complejo. Por conveniencia, para facilitar su estudio se considera que consta de cuatro pasos: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción, conocido por sus siglas como ADME [Peña, *et al.*, 2001] y como ADMET para expresar el perfil completo ADME y las propiedades toxicológicas del compuesto.

El metabolismo juega un papel crucial en los efectos farmacológicos o toxicológicos de los xenobióticos, en este marco, hay dos facetas o dos posibilidades: a) el compuesto se transforma y concluye la acción por lo que es excretado o, b) se producen metabolitos tóxicos, en cuyo caso, los compuestos originales son transformados en electrofílicos reactivos (p. ej., epóxidos alifáticos o aromáticos, quinonamidas), que se unen covalentemente con el ácido desoxirribonucleico [Liebler y Guengerich, 2005] y otras macromoléculas, o de producir interacciones no covalentes, como p. ej., estrés oxidativo.

Las hemoproteínas conocidas como citocromos P450 (CYP) están implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. El sistema isoenzimático microsomal del citocromo P450 humano está constituido por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias (en función de la semejanza de secuencias aminoacídicas) de las cuales las más importantes son las familias I, II, III y IV, que a su vez, se agrupan en subfamilias (A, B, C, D,.....) constituidas por genes polimórficos, de los cuales los más importantes son el CYP1A1 de la familia I (representa la actividad de la arilhidrocarburo hidroxilasa) y, el CYP1IC8 y CYP1ID6, de la familia II. En la carcinogénesis ambiental; se conocen más de 5 docenas de diferencias farmacológicas descritas en el *Homo sapiens* y al menos existen tres polimorfismos

de la expresión CYP450, a saber la: acetilación, debrisoquine 4-hidroxilasa y aril hidroxilasa [Coutiño, *et al.*, 2010]

La aplicación de los métodos predictivos *in silico* al área ADME, ha evolucionado favorablemente; p.ej., la modelación molecular de enzimas CYP demuestra que es posible generar modelos realistas para el metabolismo de xenobióticos mediante CYPs humanos al comparar favorablemente con estructuras cristalinas, y así pueden ser usados para derivar energías de unión a substratos estrechamente consistentes con valores cinéticos experimentales [Raunio, 2011]. Se espera que estas aplicaciones continúen evolucionando, ya que un mejor conocimiento de la dosis interna de un xenobiótico o compuesto tóxico resultaría en una mayor precisión y entendimiento en la predicción de efectos biológicos. La Fig. 5.15 sintetiza los diferentes niveles de información que pueden ser obtenidos mediante modelación y cómo esta información puede ser ingresada a las predicciones del comportamiento ADMET [Madden, 2010].



Fig. 5.15. Diagrama de flujo para la incorporación de información de ADME *in silico* para predicciones de actividad biológica [Madden, 2010]

Este enfoque implica la necesidad de evaluar la capacidad del compuesto químico para actuar como autógeno o carcinógeno genotóxicos (ecotoxicidad), lo cual es uno de los principales requerimientos regulatorios. Un paso clave en el desarrollo de categorías químicas para ecotoxicidad es definir al químico orgánico asociado con la formación de un enlace covalente entre el ADN y el compuesto químico exógeno, éste es definido como alertas estructurales.

Los modelos matemáticos actualmente disponibles para la predicción del ADME, p. ej., QSAR/QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*), debido a su naturaleza empírica presentan limitaciones en las predicciones, por lo que requieren una mayor definición de los parámetros necesarios para implementar el análisis. Además de la solubilidad, la absorción y el metabolismo de la molécula, es necesario considerar otros aspectos como la conjugación, las proteínas transportadoras del xenobiótico, mejores descriptores moleculares, etc., para optimizar los modelos. Actualmente los modelos *in silico* no son capaces de reemplazar totalmente a los modelos convencionales tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, constituyen un complemento muy valioso para cualquiera de ellos.

5.3.4 MODELACIÓN BIOCINÉTICA E INTEGRACIÓN DE DATOS

Tanto en el desarrollo de drogas como en la toxicología ambiental, los modelos PBPK, han sido piedra angular en la organización e integración de datos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, además de que permiten predecir perfiles concentración-tiempo si los valores de los parámetros pueden ser determinados de datos *in vitro* o *in vivo*, de humanos, de modelos QSAR, o bien de la literatura científica [Raunio, 2011]. Específicamente, los modelos PBPK han ayudado a definir áreas de incertidumbre y variabilidad en la evaluación de riesgos y muestran explícitamente cómo la variabilidad e incertidumbre influyen en las pruebas de toxicidad e interpretación de datos [NRC, 2007].

Existen varios software disponibles para soportar la modelación PBPK, incluyendo aproximaciones para el análisis de sensibilidad y variabilidad y para técnicas de optimización mediante Cadenas de Markov y Monte-Carlo. Algunos presentan expectativas para evaluar dosis-respuesta y analizar exposición de químicos ambientales importantes.

En la evaluación de la exposición, que es crítica en el proceso de evaluación de riesgos, el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos [CDC, 2005], aplica estos modelos en el monitoreo y vigilancia, para medir una amplia gama de químicos exógenos en tejidos, sangre y excretas humanos. Para esta agencia, la combinación de los modelos PBPK con biomonitoreo, pueden mejorar la medición de la exposición humana, lo que sin duda permite estimar de manera más precisa los riesgos para poblaciones humanas expuestas.

En el concepto de estrategias de pruebas integrales (ITS, por sus siglas en inglés), que se analizan posteriormente, Blaauboer, *et al.* [1999], plantea que una ITS es cualquier aproximación de evaluación de la toxicidad que aplique dos o más herramientas, entre las que cita información sobre: características fisicoquímicas, datos de ensayos *in vitro* e *in vivo*, datos epidemiológicos, métodos computacionales, alertas estructurales y modelos cinéticos. En la práctica, las predicciones *in silico* constituyen una parte del peso de la evidencia o parte de un ITS.

5.4 ESTRATEGIAS Y ALTERNATIVAS QUE E INCLUYEN PRUEBAS *IN SILICO* PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS TOXICOLÓGICOS

A finales del siglo XX, era claro que el uso de métodos alternativos en la evaluación de riesgos toxicológicos tenía aún muchos retos que superar. Por ejemplo, la aplicación de un nuevo compuesto químico a un cultivo celular, derivado de un tejido particular, permite la determinación de la concentración a la cual el compuesto da lugar a cierta respuesta tóxica en este tipo de células, proporcionando así información sobre el mecanismo fundamental de toxicidad, pero no de la gama de efectos tóxicos por este químico al organismo completo. Esto resulta en la necesidad de combinar varios métodos, ya sea en paralelo o en serie, antes de llevar a cabo pruebas en animales de laboratorio.

5.4.1 ASPECTOS ÉTICOS Y CIENTÍFICOS PARA ESTABLECER MÉTODOS ALTERNATIVOS A LOS ENSAYOS EN ANIMALES PARA EVALUAR LA TOXICIDAD DE COMPUESTOS QUÍMICOS EN HUMANOS

En la evaluación de los riesgos toxicológicos asociados con la exposición a compuestos químicos ambientales, es fundamental tener en mente el tipo de información con la cual se cuenta, ya que de esto depende la toma de decisiones. Más allá de los avances en biología molecular, biotecnología, bioinformática y quimioinformática, los conceptos en toxicología regulatoria han cambiado considerablemente y aún, cuando hasta ahora mucho de la toxicología humana y la normativa tanto ambiental como en salud pública descansa en los ensayos o pruebas con animales, se reconoce que en algunos casos los modelos animales no son la mejor opción.

Por otro lado, desde una perspectiva ética, desde 1959, cuando William Russell y Rex Burch, en su libro "*Principios de la técnica experimental en humanos*", acuñaron el concepto de las tres Rs (3Rs), reducción, refinamiento y reducción, ha habido numerosas consideraciones con respecto al tratamiento que los humanos dan a los animales para llevar a cabo ensayos en el laboratorio

[Liebsch, et al., 2011]. Fuera del Reino Unido, este concepto había sido aceptado sino hasta fines de la década de 1980 por instituciones de investigación.

En 1989, el Centro Nacional de Documentación y Evaluación de Métodos Alternativos a los Experimentos en Animales (ZEBET, por sus siglas en alemán), creó el primer Instituto Federal de Salud (BGA, por sus siglas en alemán), con la finalidad de promover el desarrollo y validación de procedimientos de prueba no-animales [Liebsch, *et al.*, 2011]. Con la misma visión, en 1993, la Unión Europea estableció el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) en el Centro de Investigación Joint (JRC, por sus siglas en inglés) en Ispra (Italia); Estados Unidos formó en 1997 el Centro de Coordinación Interinstitucional para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM, por sus siglas en inglés) y en 2005 el gobierno Japonés estableció el JaCVAM (Centro Japonés de Validación de Métodos Alternativos) en el Instituto Nacional de Salud en Tokio.

La misión y visión de estas instituciones está centrada en reemplazar los protocolos regulatorios de prueba en animales, con los que se identifican las propiedades tóxicas de los compuestos químicos a los cuales los humanos y organismos silvestres se encuentran expuestos, ya que se considera que la exposición de animales a compuestos químicos peligrosos pueden dar lugar al sufrimiento y la muerte. En Europa, las actuales políticas en materia de cosméticos y compuestos químicos llaman al reemplazo de las pruebas en animales por procedimientos avanzados de prueba no-animales, para la presente década [Spielmann, 2005], dado que el concepto 3Rs ha permitido reducir el número de animales y su sufrimiento.

Desde 1990, la Comisión Europea se ha responsabilizado de la investigación toxicológica bajo el concepto 3Rs, asignando recursos financieros en el campo de ciencias de la vida para el desarrollo y validación métodos alternativos con validez regulatoria para probar el uso seguro de fármacos, cosméticos, plaguicidas y otros compuestos químicos [Spielmann, 2005]; no obstante, aún es necesaria mayor información para evaluar los riesgos asociados con la exposición a esta amplia gama de agentes químicos.

Así, se requiere establecer una estrategia integral de prueba (ITS, por sus siglas en inglés); esto es, de acuerdo con lo propuesto en 1996 por el ECVAM, cualquier aproximación para evaluar toxicidad, que permita reducir, refinar o reemplazar un procedimiento existente que utilice animales y, se basa en datos generados a partir de dos o más tipos de ensayo y/o herramienta [Blaauboer, *et al.*, 1999]:

- Datos fisicoquímicos
- Datos de estudios *in vitro*

- Datos en humanos (p. ej., estudios epidemiológicos, estudios de casos clínicos, biomonitorio)
- Datos estudios en modelos animales (cuando es inevitable)
- Métodos computacionales (tales como las relaciones estructura actividad, conocidas como SAR y QSAR)
- Modelos biocinéticos

Los ensayos *in vitro* son una buena alternativa para estudiar el efecto de compuestos químicos, tanto en farmacología como en toxicología, constituyendo una herramienta de tamizaje en estudios mecanicistas en tanto que los ensayos o pruebas en animales permiten estudiar efectos sistémicos, por lo que en farmacología se utilizan como una medida surrogada para posteriormente llevar a cabo ensayos clínicos aleatorizados en humanos.

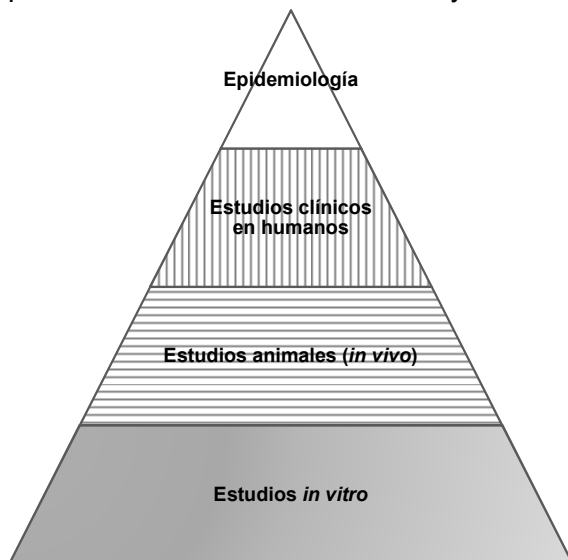


Fig. 5.16. El papel de los estudios *in vitro* en farmacología y toxicología [Spielmann, 2005]

No obstante, cuando se trata de moléculas cuya finalidad no se asocia con un beneficio, la experimentación en humanos es prácticamente imposible y se recurre a los estudios *in vitro* o *in silico* y a datos de biomonitorio, ya que la evidencia epidemiológica se limita a exposiciones ocupacionales y a contaminantes químicos ambientales como por ejemplo: el arsénico, el mercurio, el plomo, algunos plaguicidas y algunos químicos industriales. En cualquier caso, el estándar de oro para evaluar efectos tóxicos en humanos es el que se obtiene de estudios epidemiológicos (Fig. 5.16).

Si se parte de que los modelos de prueba *in vitro*, con algunas limitaciones, éstos brindarán la principal información de toxicidad en sistemas biológicos como alternativa a los modelos animales, la pregunta crítica es ¿cómo estos ensayos *in vitro* representan la situación *in vivo* y con cuánta precisión predicen efectos adversos en humanos?

5.4.2 CULTIVOS CELULARES

Los métodos basados en líneas celulares han evolucionado y mejorado a través del tiempo, desde los cultivos celulares en monocapa de células primarias, a los modelos en células madre de embriones humanos y adultos.

Los cultivos celulares primarios pueden prepararse a partir de tejidos de hígado, neuronas, riñón y piel, y se ha documentado que conservan las propiedades morfológicas y bioquímicas que caracterizan a los tejidos *in vivo*. Normalmente crecen en monocapa, pero las técnicas de crecimiento en tres dimensiones son actualmente más utilizadas, y si bien en ambos casos se tiene un modelo artificial que representa de manera simplificada la situación *in vivo*, los cultivos tridimensionales mantienen mejor las funciones específicas del órgano [Steven, 2009].

El uso de células madre para predecir el impacto de compuestos químicos sobre la salud humana, ha sido un objetivo clave en la toxicología *in vitro*. Debido a las diferencias entre especies, los humanos responden de manera diferente a la exposición química, puntualizando en la necesidad de introducir en las evaluaciones de riesgo, factores de incertidumbre que pueden variar de uno a cuatro órdenes de magnitud, esto es de 10 a 10,000 [NRC, 2000], para ser conservadores y proteger la salud. Una ventaja importante en este sistema de prueba es su potencial para revelar factores de susceptibilidad humana para enfermedades o toxicidad [Chapin y Stedman, 2009]. En la Tabla 5.7, se sintetizan las ventajas y desventajas de los principales sistemas de prueba o ensayo toxicológico *in vitro*.

Tabla 5.7. Ventajas y limitaciones de los ensayos de toxicidad *in vitro*

VENTAJAS	LIMITACIONES	NECESIDADES DE DESARROLLO
CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS		
Constituido por poblaciones mixtas de células	Requiere tejidos animales o humanos	Protocolos para estandarización y mantenimiento, con el fin de mejorar la reproducibilidad de los cultivos celulares
Explica señales de las vías moleculares y bioquímicas <i>in vivo</i>	Variabilidad en las poblaciones de células mezcladas	Caracterización de modelos celulares para propiedades morfológicas y funcionales semejantes a los modelos <i>in vivo</i>
Modelos tridimensionales han mostrado propiedades funcionales a través de períodos de tiempo prolongado	Los cultivos en monocapa bidimensionales tienen funcionalidad limitada	Desarrollo de nuevos puntos terminales para aprovechar mejor los cultivos celulares tridimensionales
Particularmente adecuados para estudios mecanicistas	Los modelos tridimensionales tienen el riesgo de necrosis central debido a la disminución de oxígeno y nutrientes disponibles	Estudios de validación para determinar la capacidad predictiva y confiabilidad de los cultivos celulares para toxicidad
Han sido desarrollados para la mayoría de los órganos humanos	Los modelos tridimensionales no siempre pueden ser estandarizados (basados en placas de 96 pozos)	

VENTAJAS	LIMITACIONES	NECESIDADES DE DESARROLLO
	Tienen capacidad predictiva limitada sobre los efectos a la salud por diferencias entre especies (preparaciones en tejidos animales)	<i>in vivo</i> o en humanos
CULTIVO DE CÉLULAS MADRE		
Potencial para predecir directamente efectos a la salud humana Auto-regenerables, por lo que se consideran una fuente ilimitada de células idénticas Diferenciación hacia varios tipos de células humanas Oportunidad para estudiar la influencia de factores genéticos y susceptibilidad en poblaciones humanas Permiten el estudio de procesos de desarrollo humano tempranos La potencialidad inducida supera los aspectos éticos y religiosos de las células madre embrionarias La pluripotencialidad inducida mejora rápidamente las aplicaciones	Conceptos éticos y religiosos sobre las células madre embrionarias Estabilidad genética y funcional poco clara por largos períodos de tiempo Dificultades para obtener cultivos puros de una célula o un número específico de tipos de células Los cultivos contienen poblaciones en varios estadíos de diferenciación celular No están bien definidas las interacciones célula-célula <i>in vivo</i> y las vías de comunicación Competencia metabólica de células madre diferenciadas no está bien definida Algunos cultivos de células madre dependen de la presencia de células para alimentarlos Las propiedades no están completamente caracterizadas	Protocolos para estandarización y mantenimiento, con el fin de mejorar la reproducibilidad de los cultivos celulares Mejorar el monitoreo para identificar los períodos de estabilidad a través del tiempo Mejorar la caracterización de las propiedades funcionales y vías de comunicación celular Clarificar la definición de competencia metabólica Continuar el desarrollo y caracterización de modelos con pluripotencialidad inducida Validar los modelos de células madre para definir su capacidad y confiabilidad para predecir toxicidad en humanos

Fuente: tomada de vanVliet, 2011

5.4.3 MODELOS ANIMALES NO-MAMÍFEROS

Los modelos animales no mamíferos más ampliamente utilizados para ensayos o pruebas toxicológicas incluyen al nematodo *Caenorhabditis elegans*, al pez *Danio erio* y a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Aunque estos organismos son evolutivamente muy distantes de los humanos, poseen un gran número de propiedades fisiológicas y farmacológicas útiles para las pruebas de toxicidad. Asimismo, estos modelos son una alternativa conveniente en términos de la disponibilidad de los organismos, costo y uso para la obtención de una gran cantidad de información con respecto a los mamíferos [vanVliet, 2011]. Por supuesto, estos sistemas, como otros utilizados en la evaluación toxicológica de compuestos químicos, tienen ventajas y limitaciones (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Ventajas y limitaciones de las pruebas de toxicidad en modelos animales no-mamíferos

VENTAJAS	LIMITACIONES	NECESIDADES DE DESARROLLO
Alta disponibilidad y costos relativamente bajos Incluye un gran número de indicadores de las vías para relevantes de toxicidad humana Los genomas han sido secuenciados y se han desarrollado diferentes genotipos La transparencia de los embriones permite la visualización rápida del desarrollo La transparencia de los embriones permite el uso de imágenes de los genes Adecuados para clasificar y probar generar gran cantidad de información en placas multi-pozo Aplicación simultánea de puntos terminales de efecto molecular y conductual para identificar asociaciones potenciales	No está bien definida la capacidad predictiva para toxicidad <i>in vivo</i> o en humanos Diferencias farmacocinéticas con los sistemas <i>in vivo</i> y humanos No está bien definida la competencia metabólica No es clara la dosis interna de compuesto después de la exposición externa	Mejorar la caracterización de la competencia metabólica Determinar de manera precisa la dosis interna (concentración) después de la dosis de exposición externa Llevar a cabo estudios de validación para definir la capacidad predictiva y confiabilidad de lo modelos animales no-mamíferos para toxicidad <i>in vivo</i> y en humanos

Fuente: tomada de vanVliet, 2011

La base de datos del programa ToxCAST de la USEPA (posteriormente se describe), puede dar mejor idea de la capacidad predictiva de los modelos animales no mamíferos para toxicidad *in vivo* y en humanos, debido a que son de interés por su potencial aplicación y uso. Es importante enfatizar en que su capacidad metabólica debe ser caracterizada y que los niveles de concentración interna en los tejidos deben ser precisados una vez que ocurren las exposiciones ambientales para poder modelar la farmacocinética del compuesto.

5.4.4 TECNOLOGÍAS DE ALTO DESEMPEÑO

En los últimos años, se han desarrollado las llamadas tecnologías de alto desempeño. Actualmente son sistemas completamente automatizados, lo que significa que éstas preparan, incuban y analizan un gran número de placas simultáneamente.

El formato de las placas ha sido optimizado para incrementar el número de compuestos y concentraciones en la prueba; sin embargo, la tecnología tiene un alto costo, la calidad del resultado depende de que la línea celular utilizada sea la adecuada y, es necesario mejorar el análisis de datos e interpretación de métodos entre otras limitaciones (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Ventajas y limitaciones de las pruebas de toxicidad de alto desempeño

VENTAJAS	LIMITACIONES	NECESIDADES DE DESARROLLO
Alta capacidad de prueba y relativamente bajo costo por compuesto probado o prueba realizada	Análisis elaborado e interpretación de grandes conjuntos de datos generados	Necesidad de mejorar el análisis de datos e interpretación de métodos
Condiciones estandarizadas de prueba	El ensayo frecuentemente se basa en líneas celulares, las cuales carecen de la complejidad de los sistemas <i>in vivo</i> o del organismo humano	Uso de modelos celulares más complejos o de modelos animales no-mamíferos que incluya indicadores de las vías relevantes <i>in vivo</i>
Reproducibilidad y robustez de los datos	Las células utilizadas generalmente tienen competencia metabólica limitada	Incluir competencia metabólica
Aplicación de genes marcados	Tiene limitaciones técnicas y logísticas para usar modelos celulares más complejos	Desarrollar pruebas de alto desempeño basadas en células humanas para definir la capacidad predictiva de los efectos a la salud humana
Posibilidad de determinar reversibilidad	Alto costo de las tecnologías de alto desempeño	Caracterizar la identidad, pureza y estabilidad de los compuestos de prueba
Permite la generación de modelos dosis-respuesta sensibles mediante ensayos de una gran cantidad de concentraciones	Los sistemas de prueba necesitan ser bien caracterizados antes de someterse a pruebas de alto desempeño para asegurar la calidad de los datos generados	Datos de calidad disponibles en bases de datos públicas para el análisis y evaluación de riesgos

Fuente: tomada de vanVliet, 2011

5.4.4.1 Pruebas de toxicidad de alto desempeño

En toxicología, las pruebas de toxicidad de alto desempeño pueden ser utilizada como una aproximación de dos manera básicas: a) se prueba un pequeño número de compuestos químicos en un gran número de ensayos para identificar vías de toxicidad y, b) se prueba un gran número de compuestos químicos en un pequeño número de ensayos para identificar modos de acción similares (p. ej., los disruptores endocrinos interactúan con receptores estrogénicos).

En la práctica, frecuentemente se crea la prueba para el máximo número de químicos en un gran número de ensayos relevantes. Dado que la calidad de los datos depende de que los sistemas biológicos sean los adecuados, se requiere del uso de líneas celulares dirigidas a blancos específicos, tales como vías medidas por un receptor o vías de transducción. Los sistemas más complejos como células madre diferenciadas, células primarias y animales no mamíferos están siendo cada vez más utilizadas debido a que proporcionan información de mayor relevancia para las predicciones de toxicidad [Fernández, *et al.*, 2009].

Los puntos finales o respuestas tóxicas observadas en los sistemas de alto desempeño, frecuentemente se dirigen a blancos moleculares tales como señal de transducción, unión a

receptores nucleares y de membrana, activación de canales iónicos, actividad de enzimas, apoptosis, estrés oxidativo, proliferación celular, recombinación de ácido desoxirribonucleico y ciclo celular [Schoonen, *et al.*, 2009].

Hay algunos blancos moleculares en desarrollo, que incluyen transportadores de fármacos, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-ácido ribonucleico e interacciones proteína-ácido desoxirribonucleico. En particular, el ensayo con genes está siendo aplicado, en éste, un gen marcado (fluorescente) se agrega al gen de interés en el sistema biológico, este ensayo es muy sensible y permite detectar alteraciones en la expresión del gen después de la exposición al químico [vanVliet, 2011].

5.4.4.2 Estrategias integrales de prueba

El diseño de estrategias de prueba, hace uso de información existente y genera información nueva, con la finalidad de incrementar la calidad de las evaluaciones de riesgo para proteger mejor la salud humana, reduciendo costos, tiempo y uso de animales para experimentación (Tabla 5.10 Tabla 5.10). Generalmente se basan en la realización de ensayos por etapas, tomando decisiones en puntos intermedios, a través de etapas sucesivas, esto es diferente de las baterías de pruebas, en las que una serie de compuestos químicos son simultáneamente probados mediante una serie de ensayos seleccionados. Así, en cada etapa, los resultados se evalúan para decidir si hay información suficiente acerca de un compuesto químico, o es necesario continuar haciendo pruebas, hasta que se tienen datos suficientes y de calidad para llevar a cabo la evaluación de riesgos.

Tabla 5.10. Ventajas y limitaciones de las estrategias de prueba integrales

VENTAJAS	LIMITACIONES	NECESIDADES DE DESARROLLO
Más eficiencia en tiempo y costos comparado con las baterías de pruebas La decisión entre etapas permite discriminar químicos para los cuales hay suficiente información y así se excluyen del proceso Reduce el riesgo de falsos positivos Potencial para reducir tiempo, costos y el número de animales para pruebas de toxicidad <i>in vivo</i>	El diseño de las estrategias es complejo Experiencia limitada en la aplicación Número limitado de ensayos que pueden ser incluidos para mantener la factibilidad Proceso de validación poco claro Altos costos y trabajo requerido para una validación prospectiva	Investigar el diseño óptimo de estrategias Llevar a cabo estudios robustos usando algunas estrategias relativamente sencillas al inicio Explorar principios de validación prospectiva Llevar a cabo estudios de validación prospectiva usando datos existentes Involucrar a los reguladores para la aplicación y aprobación de las estrategias de prueba

Fuente: tomada de vanVliet, 2011

En particular, las relaciones cuantitativas estructura-actividad o análisis QSAR, si bien no es suficiente para para la evaluación de riesgos, sí constituye una herramienta útil para categorizar compuestos en diferentes clases de toxicidad y así identificar el tipo de ensayos más adecuado para continuar con la estrategia. Más allá de esto, los modelos QSAR son útiles para priorizar compuestos de mayor peligrosidad para la salud humana.

5.4.5 ESQUEMAS INTEGRALES PARA EVALUAR TOXICIDAD

Muchos ITS han sido propuestos en la literatura científica, aunque relativamente pocos han sido acordados o aceptados a nivel regulatorio y publicados en documentos guía para tales fines, y si bien estos ITS tienen algunas diferencias, todos coinciden en combinar métodos prueba y no-prueba (computacionales) de manera óptima con la finalidad de [Kinsner, *et al.*, 2009]:

- a) Incrementar la eficiencia y la efectividad de las evaluaciones de peligrosidad y riesgo
- b) Minimizar costos
- c) Cuando sea posible, reducir, refinar y remplazar las pruebas de toxicidad en animales, asegurando suficientemente la protección de la salud humana y el ambiente

Finalmente, las ITS también tienen aplicación en las actividades investigativas, dirigidas a generar información sobre mecanismos específicos, a fin de mejorar la predicción de efectos adversos no esperados y a mejorar la evaluación de riesgos; en este punto, la introducción de los modelos *in vitro/in silico* como complemento a la normativa, ayuda a mejorar el conocimiento sobre los mecanismos de toxicidad y cubrir huecos en la predicción de efectos adversos severos en humanos [Kinsner-Ovaskaimen, *et al.*, 2009].

5.4.5.1 Visión del Consejo Nacional de Ciencias de Estados Unidos

En el desarrollo de la visión de las pruebas de toxicidad, el Comité del NRC, exploró cuatro opciones (Tabla 5.11). La primera opción (I) aplica a las actuales prácticas de prueba. En consecuencia, utilizaría principalmente las pruebas de toxicidad en animal de laboratorio *in vivo* para predecir riesgos para la salud humana, los problemas ineludibles son las dificultades en la interpretación de datos obtenidos a dosis elevadas con respecto a los riesgos en la población humana heterogénea, entre otros ya anotados antes.

Tabla 5.11. Opciones para futuras estrategias de pruebas de toxicidad

OPCIÓN I <i>IN VIVO</i>	OPCIÓN II ETAPAS <i>IN VIVO</i>	OPCIÓN III <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	OPCIÓN IV <i>IN VITRO</i>
Biología animal	Biología animal	Biología principalmente	Biología

OPCIÓN I <i>IN VIVO</i>	OPCIÓN II ETAPAS <i>IN VIVO</i>	OPCIÓN III <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	OPCIÓN IV <i>IN VITRO</i>
		humana	principalmente humana
Altas dosis	Altas dosis	Amplio rango de dosis	Amplio rango de dosis
Bajo desempeño	Mejor desempeño	Desempeño medio a alto	Alto desempeño
Altos costos	Menos costosos	Menos costosos	Menos costoso
Períodos de prueba largos	Consumen menos tiempo	Consumen menos tiempo	Consumen menos tiempo
Uso de un número relativamente grande de animales de laboratorio	Uso de pocos animales de laboratorio	Uso de un número de substancialmente menor de animales	No hay uso de animales
Basado en puntos de terminación apical	Basado en puntos de terminación apical	Basado en alteraciones de respuestas celulares críticas	Basado en alteraciones de respuestas celulares críticas
	Tamizaje mediante aproximación computacional e <i>in vitro</i> ; más flexibilidad que los actuales métodos	Tamizaje usando aproximaciones computacionales cuando es posible; estudios limitados en animales que se enfocan sobre el mecanismo y metabolismo	Uso de tamizaje con aproximaciones computacionales

Fuente: tomado de NRC, 2007

El uso de las pruebas por etapas, como se verá posteriormente, soluciona algunos de los problemas relacionados con los actuales protocolos de prueba *in vivo*, ya que la meta es generar datos confiables para una evaluación más eficiente de los riesgos potenciales a la salud humana asociados con contaminantes ambientales, tomando en consideración el conocimiento sobre el compuesto químico y sus clases, así como sus modos de acción o mecanismos.

Las pruebas por etapas han sido recomendadas para evaluar toxicidad de productos agrícolas, tamizaje de disruptores endocrinos, evaluación de toxicidad del desarrollo y carcinogenicidad de productos químicos

5.4.5.2 Prueba integral de toxicidad ERGATT/CFN²

El esquema en paralelo, utiliza “un análisis elemental”, el cual es considerado más eficiente que los ensayos en animales para evaluar la toxicidad de compuestos químicos. El supuesto que subyace es que el modo de acción puede ser dividido en elementos biocinéticos y celulares o eventos, cada uno de los cuales puede ser identificado y cuantificado, mediante un sistema de modelación apropiado.

El uso de baterías de pruebas para predecir varios tipos de toxicidad local y sistémica en combinación con modelación biocinética puede dar un perfil toxicológico integral para el químico que se esté evaluando [Blaauboer, et al., 1999; Prieto, et al., 2006]. En la Tabla 5.12 se listan los bloques que constituyen esta estrategia y se representan en la Fig. 5.17; **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 5.12. Bloques que componen el esquema europeo de la estrategia integral de pruebas de toxicidad ERGATT/CFN

TIPO DE BLOQUE	DESCRIPCIÓN
Experimental	Colección de datos <i>in vitro</i> para: Parámetros biocinéticos, incluyendo biotransformación Datos de citotoxicidad, neurotoxicidad, etc. (en diferentes sistemas <i>in vitro</i>)
Modelación	Incorporación de datos <i>in vitro</i> en un modelo biocinético con ase fisiológica Determinación de la concentración en el tejido blanco Modelación de la respuesta toxicológica Predicción de la toxicidad sistémica
Validación	Validación del modelo vs cinéticas <i>in vivo</i> Validación del modelo vs toxicidad <i>in vivo</i>

Fuente: Blaauboer, et al., 1999

5.4.5.3 Esquema propuesto por Blaauboer y colaboradores

En el esquema por etapas, el conocimiento del potencial de un compuesto químico para causar un efecto tóxico particular se usa para decidir sobre la necesidad de otras pruebas, iniciando con la información de la estructura del compuesto, sus propiedades fisicoquímicas y modelos QSAR como proponen Blaauboer y colaboradores [1999] (Fig. 5.18).

² European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing/Swedihns Borrad of Laboratory Animals

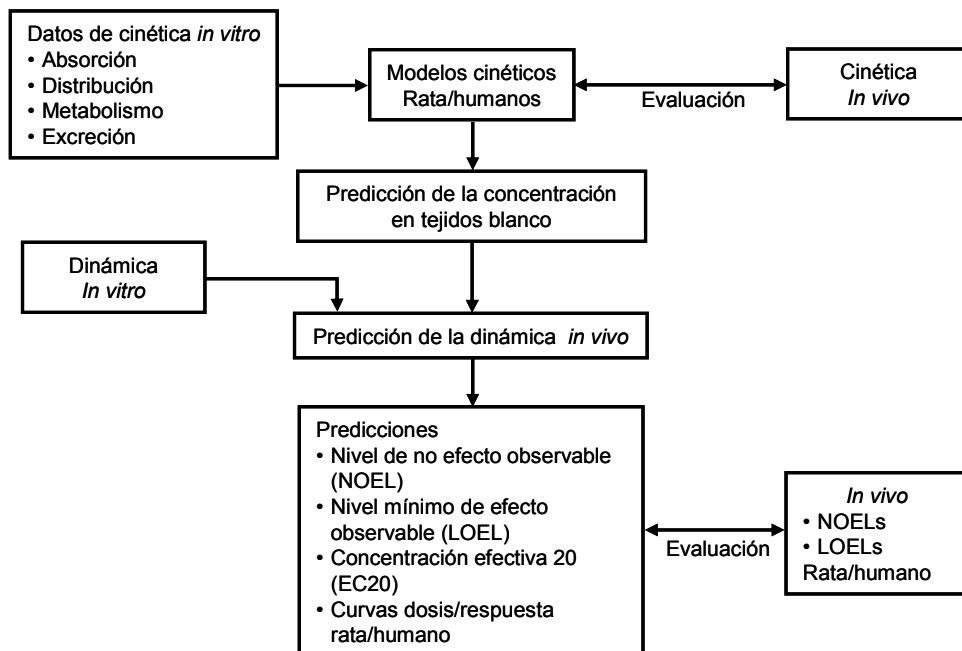


Fig. 5.17. Construcción de los bloques del esquema europeo de pruebas de toxicidad integradas (ECITTS, por sus siglas en inglés) ERGATT/CFN [Blaauboer, *et al.*, 1999]

A manera de ejemplo, la aplicación de este esquema por etapas para evaluar neurotoxicidad puede ser simplificado, aunque los elementos clave no deben ser obviados. El proceso inicia considerando la estructura química del compuesto de interés, las propiedades fisicoquímicas y los correspondientes grupos funcionales. Posiblemente se puedan construir modelos cuantitativos estructura-actividad (QSARs) capaces de predecir actividades biológicas para órganos o tejidos específicos para grupos específicos de compuestos químicos a partir de la información disponible. Cabe señalar que, para la mayoría de los compuestos químicos es necesario tomar en cuenta su biocinética.

Asimismo, los modelos biocinéticos, en combinación con las mediciones de citotoxicidad basal podrían ser utilizados para predecir la dosis a la cual el químico daría lugar a respuestas no específicas, por ejemplo en el encéfalo o en el sistema nervioso periférico. Si tal predicción no es posible, entonces habrá que llevar a cabo en un sistema neuronal, una batería de pruebas *in vitro*. Si se observa una alta proporción de citotoxicidad general/citotoxicidad específica en estos sistemas *in vitro* y las consideraciones biocinéticas indican acumulación del químico en el

sistema nervioso, es necesario llevar a cabo una evaluación de la actividad neurotóxica aguda o crónica, recurriendo a los sistemas *in vivo*, sólo si no es posible la predicción.

Un esquema genérico más sencillo, utilizando combinaciones en etapas de ensayos no animales fue reportado por Knight [2008], éste integra co-cultivos celulares, el uso de la toxicogenómica y los ensayos clínicos en humanos (Fig. 5.19), los cuales no siempre son factibles.

5.4.5.4 Aplicación de una estrategia integrada de prueba al programa de tamizaje de disrupción endocrina de la USEPA

En respuesta a las modificaciones que se hicieron a la Ley de Cosméticos de la FDA, la USEPA instauró el Programa de Tamizaje de Disruptores Endocrinos (EDSP, por sus siglas en inglés) para evaluar posibles efectos de compuestos químicos sobre los sistemas estrogénicos (E), androgénicos (A) y tiroideos (T) de humanos y formas de vida silvestre. El programa actual está organizado en dos etapas.

La Etapa 1 está constituida por cinco ensayos *in vitro* y seis *in vivo*, dirigidos a “identificar sustancias que tienen el potencial de interactuar con los sistemas hormonales EAT. La batería de ensayos de la etapa 2 consiste en pruebas en especies de vertebrados para determinar toxicidad del desarrollo y reproductiva (

Tabla 5.13), y está diseñada para identificar y establecer relaciones dosis-respuesta para cualquier efecto adverso relacionado con el sistema endocrino [Willet, *et al.*, 2011].

Willet, *et al.* [2011], proponen, más que la aplicación de la batería de pruebas de la Etapa 2, un marco de prueba multinivel combinado con una evaluación iterativa en cada paso (Fig. 5.20).

El esquema de prueba es semejante al marco conceptual de OECD (Tabla 5.14), para llevar a cabo pruebas y evaluación de disruptores endocrinos.

Ambas estrategias asignan información a diferentes niveles, pero Willet *et al.*, permiten la evaluación y decisión en cada nivel para considerar la necesidad de continuar y decidir si las pruebas posteriores son relevantes. Este proceso secuencial de interpretación y evaluación de datos depende del peso de la evidencia que considera información tanto mecanicista como apical; entre más datos soporten una conclusión particular, mayor confiabilidad tendrá tal conclusión. Así, este proceso iterativo a la medida de la estrategia de prueba integral (ITS).

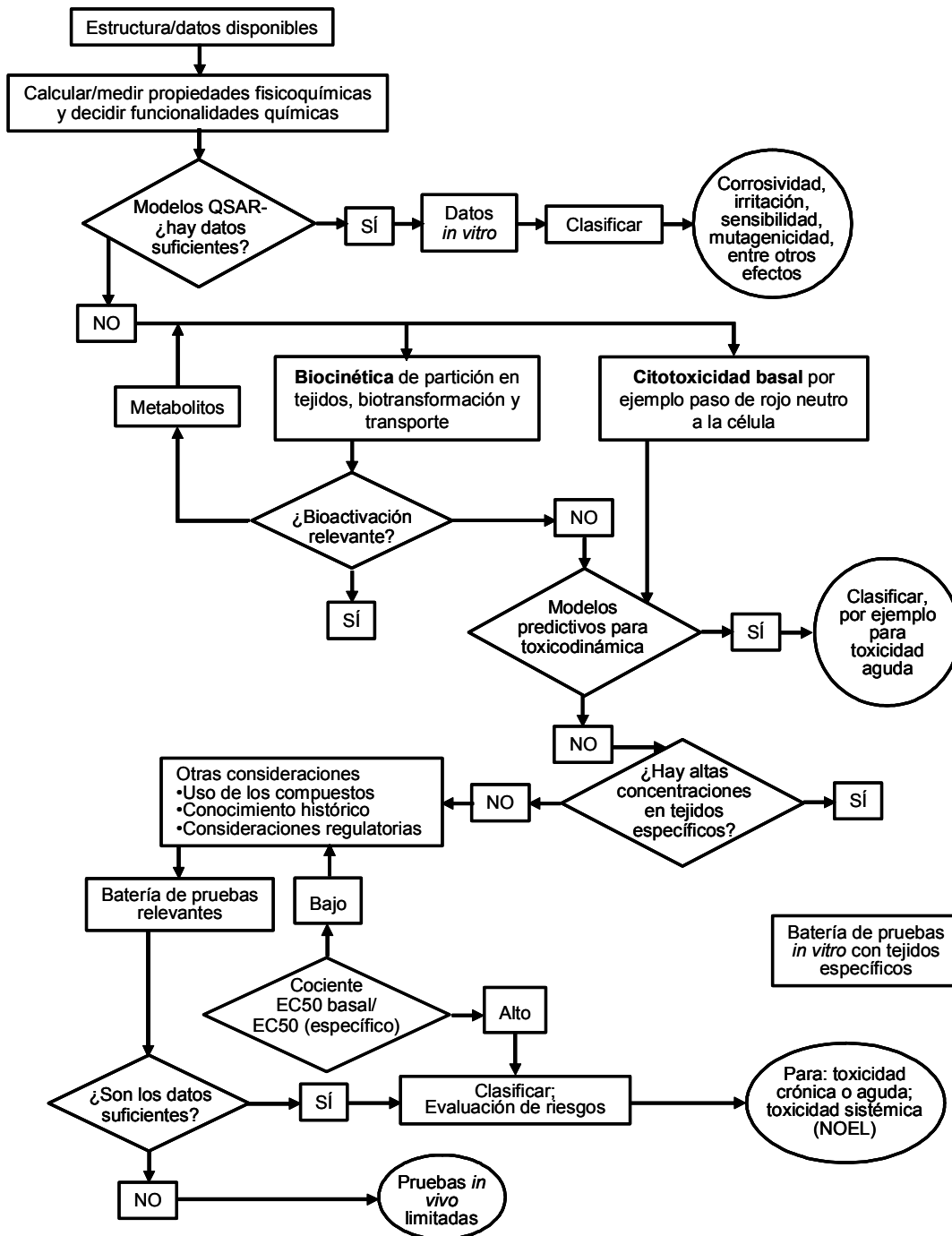


Fig. 5.18. Esquema genérico propuesto por Blaauboer y colaboradores para evaluar toxicidad de compuestos químicos [Blaauboer, et al., 1999]

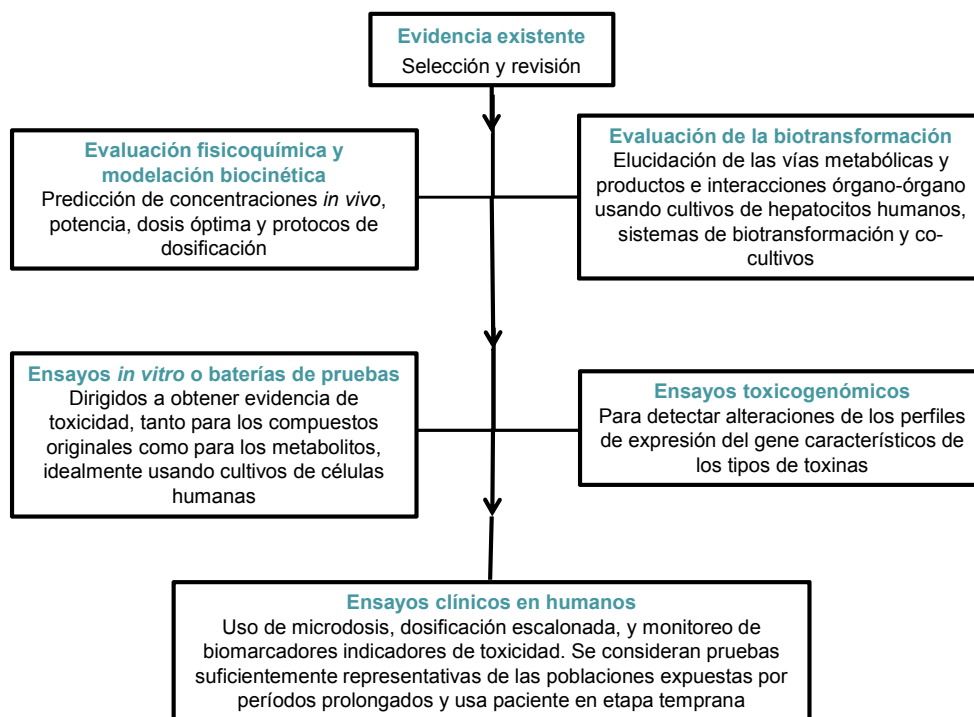


Fig. 5.19. Pruebas de toxicidad integral [Knight, 2008]

Tabla 5.13. Pruebas de la Etapa 2 atribuidas al EDSP

PRUEBAS	
Toxicidad reproductiva en dos generaciones de mamíferos o	Pruebas de toxicidad en dos generaciones de aves- pruebas de toxicidad en dos generaciones de
Pruebas de toxicidad reproductiva extendida a una generación	codornices japonesas
Pruebas de crecimiento y desarrollo en anfibios-crecimiento de larvas de anfibios y ensayos de desarrollo	Pruebas multigeneracionales en peces-prueba Medada de multigeneración
	Pruebas de dos generaciones de invertebrados-prueba Mysid de dos generaciones

Fuente: tomada de Willet, *et al.*, 2011

La información de los niveles 1 y 2 puede ser utilizada para priorizar químicos que deban ser sometidos a futura evaluación. Además, la información del nivel 2 es útil para dirigir y enfocar cualquier ensayo potencial a futuro. En ausencia de información sobre el metabolismo, la evaluación del nivel 3 puede ser utilizada para verificar los hallazgos del nivel 2. Las pruebas del nivel 4 o 5 proporcionan información sobre efectos adversos, si se requiere para situaciones regulatorias particulares.

Es importante notar que los modelos QSAR están siendo utilizados como una de las herramientas de mayor costo-efectividad para estimar el efecto de los compuestos químicos sobre los ecosistemas y la salud humana, y son particularmente útiles cuando hay pocas mediciones del químico en cuestión. Estos modelos pueden ser empleados para la evaluación de factores tales como metabolismo, transformación y bioconcentración, y para predecir disrupción endocrina debida a las propiedades que algunas sustancias poseen para unirse al receptor de estrógeno (ER) y andrógeno (AR). Así, los modelos QSAR son relevantes en los niveles 1 y como complemento del 2 para establecer prioridades a partir de la predicción de los mecanismos para causar un efecto.

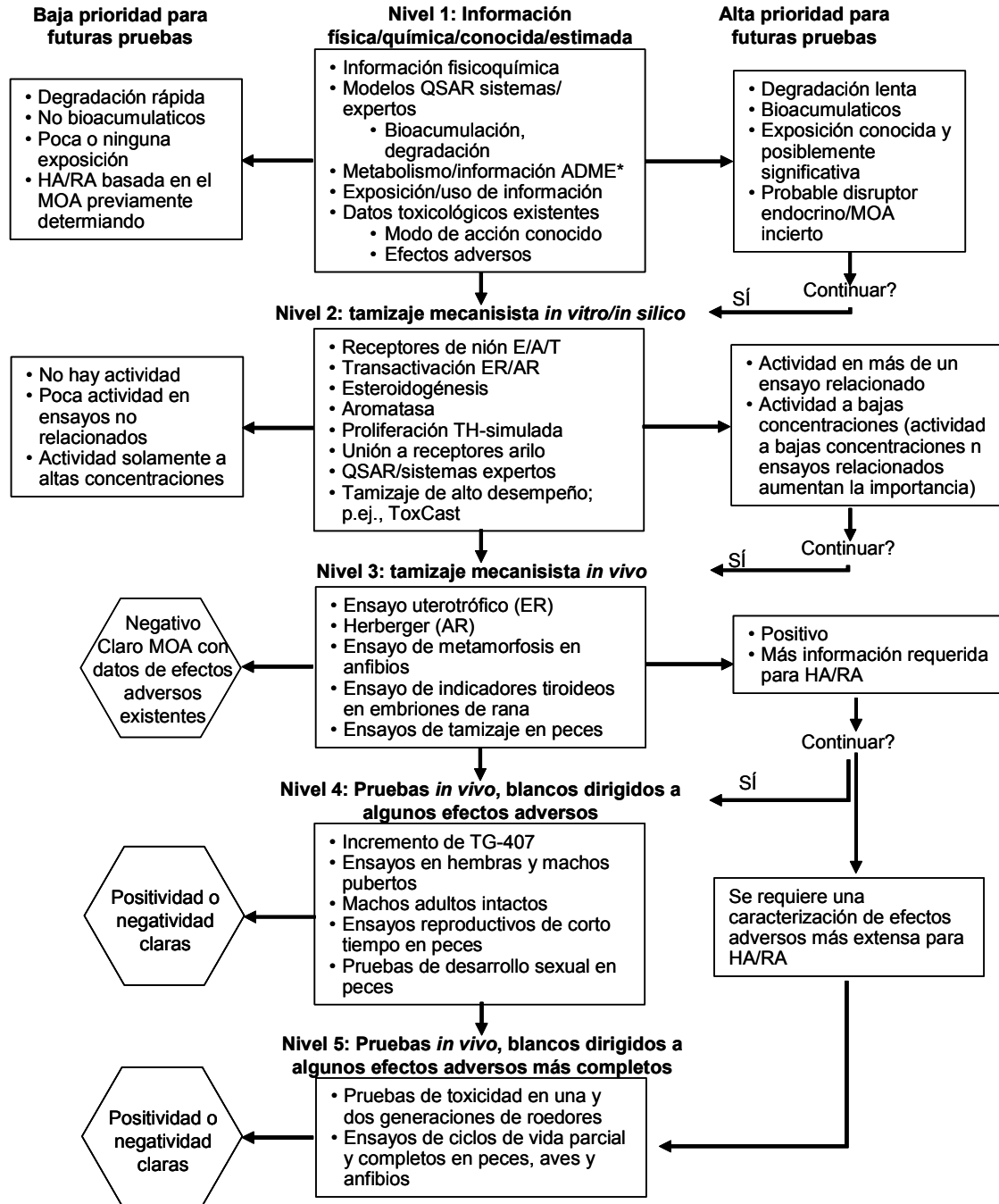


Fig. 5.20. Propuesta para evaluar actividad estrogénica, androgénica y tiroidea de compuestos químicos ambientales [Willet, et al., 2011]

Tabla 5.14. Marco conceptual de la OECD para el tamizaje de disruptores endocrinos (actualizado a 2002)

NIVELES	
1: clasificación y priorización basada en información existente	Propiedades físicas y químicas, exposición humana y ambiental, peligrosidad (datos toxicológicos existentes), QSAR para metabolismo, Biocumulación, etc.
2: ensayos <i>in vitro</i> para obtener datos mecanicistas	Receptores de unión a estrógenos, andrógenos y tiroideos; activación transcripcional vía ER , AR, TR; aromatasa; esteroidogenesis; QSAR para actividad ER o AR; tamizaje de alto desempeño; función tiroidea y, vitelogenina hepática en peces
3: ensayos <i>in vivo</i> para obtener información acerca de mecanismos particulares y efectos	Prueba uterotrónica; Heshberger; ensayos de metamorfosis en anfibios; ensayos de indicadores tiroideos en embriones de <i>Xenopus</i> (vitelogenina en peces)
4: Ensayos <i>in vivo</i> para obtener datos de mecanismos y efectos múltiples	Ensayos en machos y hembras pubertos; ensayos en adultos intactos; ensayos de corto plazo en peces; ensayos de desarrollo sexual en peces
5: ensayos <i>in vivo</i> para obtener datos sobre efectos por mecanismo endocrino y otros mecanismos	Pruebas de toxicidad reproductiva en una y dos generaciones de roedores, estudio ampliado de toxicidad reproductiva en una generación; ensayos del ciclo de vida parcial y completo en peces, aves y anfibios

Fuente: tomada de Willet, *et al.*, 2011

Adicional a la información fisicoquímica, la información disponible sobre la toxicidad y mecanismos o modos de acción (MOA) pueden también ser útiles en la priorización de compuestos químicos.

5.5 LA CIENCIA DE LA EXPOSICIÓN

Weis, *et al.* [2005], analizaron información sobre las nuevas tecnologías y métodos para evaluar la exposición humana a sustancias químicas, las cuales al considerar factores dietéticos y de estilo de vida, agentes infecciosos y otros factores estresantes, brindan una oportunidad para ampliar el alcance de las investigaciones de salud humana y avanzar en la comprensión de la relación entre enfermedad y exposición ambiental. Los autores discuten sobre la "caja de herramientas" de métodos de medición exposición externa (ambiental) e interna (biológica) y evaluar comportamientos humanos que influyen en la probabilidad de exposición a agentes ambientales.

Los métodos de cuantificación de la exposición, utilizan sensores ambientales, sistemas de información geográfica, sensores biológicos, toxicogenómica y mediciones de la carga de los contaminantes en el organismo (Tabla 5.15).

Tabla 5.15. Herramientas para la evaluación de la exposición, tecnologías y actividades para integrar a la investigación en salud humana y ambiente

TECNOLOGÍA	ACTIVIDADES DE PRIMERA GENERACIÓN	ACTIVIDADES DE SEGUNDA GENERACIÓN
Todas las tecnología	<ul style="list-style-type: none"> • Identificar enfermedades prioritarias, factores de exposición ambiental plausibles (incluyendo dieta, estilo de vida y agentes infecciosos), determinantes genéticos, vías biológicas y sistemas modelo • Identificar y revisar literatura científica y bases de datos disponibles • Establecer prioridades de investigación 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollar rangos basales y estudiar patrones de distribución en la población para priorizar exposiciones ambientales, parámetros respuesta y variantes genéticas
Sensores ambientales	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollar y validar sensores <i>in vitro</i> para detectar y cuantificar exposiciones ambientales prioritarias • Desarrollar herramientas analíticas y aproximaciones para relacionar datos ambientales a través de múltiples escalas, de macro-ambiental a personal 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollar sensores multiplex para monitoreo continuo de exposiciones ambientales • Desarrollar redes integrales de sensores
Sistemas de información geográfica (GIS, por sus siglas en inglés)	<ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar conjuntos de datos ambientales y poblacionales para pantallas de GIS • Desarrollar y aplicar modelos y herramientas de mapeo para relacionar datos ambientales y exposición personal para identificar poblaciones en riesgo 	<ul style="list-style-type: none"> • Iniciar estudios que usen sensores ambientales y biológicos y otros métodos de evaluación de exposición con la finalidad de generar pantallas de GIS para evaluación de exposición individualizada en estudios blanco
Sensores biológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollar sensores personales para monitorear patrones de actividad • Desarrollar gestión de datos analíticos para soportar dispositivos biológicos de detección • Desarrollar sensores de diagnóstico <i>in vitro</i> para monitorear respuestas biológicas tempranas a factores ambientales 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollar sensores desplegables <i>in vivo</i> (microescala y nanoescala) para monitorear respuestas biológicas a exposiciones prioritarias • Desarrollar redes de sensores

TECNOLOGÍA	ACTIVIDADES DE PRIMERA GENERACIÓN	ACTIVIDADES DE SEGUNDA GENERACIÓN
Toxicogenómica	<p>prioritarios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar plataformas tecnológicas • Desarrollar datos y tecnología estándares • Desarrollar y mejorar los métodos de preparación y análisis de muestras (de alto desempeño) • Iniciar estudios para desarrollar señales moleculares en humanos y animales como marcadores de exposición, respuesta y susceptibilidad y definir procesos de enfermedad 	<ul style="list-style-type: none"> • Conducir estudios en humanos y animales para validar señales moleculares como marcadores de exposición, respuesta y susceptibilidad y definir vías de respuesta biológica para exposiciones prioritarias y respuestas

Fuente: tomada de Weiss, *et al.*, 2005

El marco conceptual propuesto por Weiss y colaboradores [2005], para llevar estas tecnologías al uso y aceptación por parte de la comunidad científica se centra en el entendimiento de enfermedades humanas complejas usando un enfoque integrado de evaluación de la exposición, para definir relaciones particulares exposición-enfermedad y su interacción con factores genéticos y ambientales.

5.6 EVOLUCIÓN DE LA TOXICOLOGÍA REGULATORIA

En materia de protección a la salud humana, no es posible separar los desarrollos científicos y tecnológicos, de la normativa ambiental y de salud pública. Sin duda, la preocupación por la protección de la salud humana y el ambiente han promovido cambios que pueden considerarse significativos en la regulación de las sustancias químicas, principalmente en países industrializados de Europa, en Estados Unidos, Canadá y en Australia, debido en gran medida a eventos extraordinarios o tragedias tales como la del Elixir de Sulfanilamida³ en 1937 y de la talidomida⁴ en 1958 a 1963 [FDA, <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History>], que

³ Elixir de sulfanilamida: solución de sulfanilamida en dietilenglicol que causó al menos 107 muertes incluyendo niños en Estados Unidos, en el año de 1937

⁴ Talidomía: fármaco utilizado para controlar las náuseas durante el primer trimestre de embarazo, utilizado entre 1958 y 1963. Tuvo efectos teratogénicos (malformaciones congénitas) en el feto.

revelaron, en su momento, lo inadecuado y poco protector de la legislación vigente en materia de medicamentos, aditivos para alimentos y del uso de otros químicos industriales.

Cada país tiene su propia legislación en materia de sustancias tóxicas, protección de la salud pública y del ambiente. Puede decirse que con respecto a los fármacos, considerados como contaminantes emergentes cuando son liberados al ambiente, existen varias generaciones de leyes para su control; la primera de ellas, hasta los años sesenta, exige la seguridad del fármaco pero no implica su eficacia; el caso de la talidomida va a dar lugar a un giro muy importante, ya que se empieza a exigir seguridad y eficacia demostrada con ensayos clínicos controlados, [Vega, 2004, <http://www.bioeticaweb.com/content/view/45/737/>], lo que implica el cumplimiento de la legislación internacional en el campo de la ética de la investigación biomédica.

Como resultado de la colaboración en el campo de la ética de la investigación entre la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), este último publicó en 1982 el documento *Proposed International Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects* (Pautas Internacionales Propuestas para la Investigación Biomédica en Seres Humanos) cuyo objetivo era indicar cómo podrían aplicarse eficazmente los principios éticos fundamentales que guían la investigación biomédica en seres humanos, tal como se establece en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, especialmente en los países en desarrollo, teniendo en consideración su cultura, sus circunstancias socioeconómicas, sus leyes nacionales y sus disposiciones ejecutivas y administrativas.

Entre otros objetivos, la investigación realizada en seres humanos incluye también aquella en que se manejan factores ambientales que podrían afectar a personas expuestas de manera fortuita o involuntaria, lo que abarca estudios de organismos patógenos y sustancias químicas tóxicas liberados al ambiente a través de diferentes vías, de tal manera que entre otros requerimientos de las Pautas Internacionales, es obligatorio que haya consentimiento informado y participación voluntaria en la investigación.

Lo anterior es importante, debido a que desde finales de la década de 1960, la preocupación acerca de los efectos de la contaminación en los ecosistemas y la salud pública han ido en aumento.

5.6.1 ESTADOS UNIDOS

En Estados Unidos, como resultado de la tragedia de 1937, el Congreso aprobó el Acta de Alimentos, Drogas y Cosméticos (FDCA, por sus siglas en inglés) de 1938, la cual requería

evidencia generada en un proceso de investigación sobre la efectividad del uso terapéutico de fármacos, esto es, evidencia obtenida de pruebas de toxicidad en animales, antes de su comercialización. A partir de entonces, el Acta ha sido modificada [NRC, 2007]:

1958, la FDCA, incluye requerimientos para que la industria alimentaria demuestre la seguridad de los aditivos para alimentos. La Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) adquiere autoridad para desarrollar estudios de toxicidad para evaluar aditivos de alimentos y especificar criterios de evaluación

1962, enmienda conocida como Kefauver-Harris, que requirió pruebas de la seguridad y eficacia de las drogas, lo que conlleva un mayor número de experimentos

De aquí, surgen los primeros protocolos modernos en toxicología, que han sido el fundamentales en la definición de los programas para las pruebas de toxicidad que actualmente se encuentran en uso [NRC. 2007], considerando que la industria farmacéutica debe demostrar que la droga o fármaco cumple con el efecto biológico deseado, y la industria alimentaria debe demostrar la ausencia de efectos biológicos observables.

Posteriormente, como resultado de la preocupación de la población acerca de las exposiciones a compuestos químicos ambientales a finales de la década de 1960, se instituyó la Agencia de Protección Ambiental (USEPA, por sus siglas en inglés), con la responsabilidad de “proteger la salud humana y salvaguardar el ambiente natural-aire, agua y suelo-de los cuales depende la vida”. Desde entonces, la USEPA ha desarrollado estrategias para probar la toxicidad de plaguicidas y químicos industriales, que eventualmente se encuentran como residuos de alimentos o como contaminantes ambientales [NRC, 2007].

Es importante señalar que si bien la USEPA fue instaurada en 1970, su influencia en materia ambiental y protección de la salud ha sido muy importante no sólo en la emisión de leyes y regulaciones de las últimas cuatro décadas, sino también en las enmiendas y modificaciones que se han hecho a legislaciones anteriores. La legislación directa o indirectamente relacionada con la protección del ambiente, los recursos hídricos y los efectos del ambiente sobre la salud pública en Estados Unidos, inicia en la década de 1940, influyendo en la legislación ambiental a escala internacional. A continuación se listan en orden cronológico, las leyes federales que para fines del presente proyecto se considera han sido relevantes en la protección de la salud pública y ambiental:

- 1947.- *Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FRIFRA)*
- 1948.- *Ley Federal para Control de la Contaminación del Agua*
- 1965.- *Ley Sobre Disposición de Desechos Sólidos*

- 1969.- *Ley Nacional de Política Ambiental (NEPA)*
- 1972.- *Reformas a la Ley Federal de Control de la Contaminación del Agua de 1972 (FWPCA)*. (P. L. 92-500)
- 1972.- *Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FRIFRA)*. Modificada por la Ley de Protección de Alimentos de 1996
- 1974.- *Ley de Agua Potable Segura*
- 1975.- Ley de Transporte de Materiales Peligrosos
- 1976.- *Ley de Control de Sustancias Tóxicas (TSCA)*
- 1977.- *Ley de Agua Limpia*. Modificación a la FWPCA de 1972
- 1980.- *Ley de Responsabilidad, Compensación y Recuperación Ambiental (CERCLA)*
- 1980.- *Ley de Conservación de Peces y Vida silvestre*
- 1986.- Modificaciones a la Ley de Agua Potable Segura
- 1986.- *Modificaciones al Programa Superfund⁵ y Ley de Reautorización (SARA)*
- 1987.- *Ley de Calidad del Agua. Modificación a la FWPCA de 1972*
- 1996.- Ley de Protección de la Calidad de Alimentos (FQPA, es la modificación de la FIFRA)
- 1996.- *Modificación a la Ley de Agua Potable Segura*

La FRIFRA de 1947, requería el registro de los plaguicidas antes de su comercialización ya fuese al interior del territorio o para el exterior. En 1972, esta actividad originalmente responsabilidad del Departamento de Agricultura y en el marco de las enmiendas a esta ley, dicha responsabilidad fue conferida a la USEPA, con autoridad para clasificar plaguicidas y regular los residuos. Esto trajo consigo la necesidad de probar que estos agroquímicos no causan efectos adversos a la salud y al ambiente “más allá de los razonables”. Este cambio trajo consigo la estrategia de pruebas o ensayos toxicológicos que emergieron en la USEPA [NRC, 2007].

⁵ Superfund es el programa del gobierno federal encargado de limpiar, mejorar o restaurar los sitios que contienen desperdicios peligrosos y los cuales están sin control.

Por su parte, la FDA mediante la Modificación Miller a FDCA, en 1954, establece procedimientos para fijar límites de seguridad de residuos de plaguicidas en materias primas agrícolas [FDA, <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History>], requiriendo un “nivel máximo aceptable” (tolerancia) en alimentos para humanos y veterinarios.

Las enmiendas o modificaciones a la FIFRA, esto es la FQPA de 1996, y a la FDCA, cambiaron de manera fundamental el enfoque regulatorio de la USEPA para los plaguicidas; uno de los puntos más relevantes fue el de fijar estándares de residuos de este tipo de compuestos en todos los alimentos con criterios de riesgo, lo que incluye todas las fuentes de exposición no ocupacional y exposición a más de un plaguicida con el mismo mecanismo de toxicidad (efectos acumulativos), cuando se establecen tolerancias. La Agencia también se incluyó un factor de seguridad de 10 adicional para establecer estos niveles o tolerancias, lo que permite proteger poblaciones sensibles como son los infantes y los niños, y se vio en la necesidad de desarrollar e implementar un programa de tamizaje de disruptores endocrinos [USEPA, 2006, http://www.epa.gov/pesticides/regulating/laws/fqpa/fqpa_accomplishments.htm].

La implementación de la FQPA, requirió el desarrollo de evaluaciones de riesgo, con un refinamiento tal que reflejaran la realidad y que dieran un margen adecuado de seguridad para la protección de infantes y niños, lo que llevó a innovar las herramientas y métodos para identificar aquéllos químicos con mayor potencial para afectar la salud humana y el ambiente, considerando rutas (inhalación, ingestión y contacto dérmico) y fuentes múltiples de exposición (agua, alimentos y el hogar y otras fuentes no ocupacionales), así como riesgos acumulativos [USEPA, 2006].

La actual estrategia para llevar a cabo pruebas de toxicidad para plaguicidas, son resultado tanto de la FIFRA como de la FDCA y sus modificaciones; dicha estrategia difiere de empleada para químicos industriales y requiere de una gran cantidad de ensayos antes de que un plaguicida pueda salir al mercado [NRC, 2007].

La Ley para el Control de las Sustancias Tóxicas (TSCA), emitida en 1976, como ya se anotó, está dirigida al control de compuestos químicos industriales nuevos y existentes que no son regulados por otras leyes o estatutos. Los fabricantes están obligados a presentar información antes de la producción (identidad del compuesto químico, uso, proceso de fabricación y exposición esperada), pero no se les requiere a informar sobre la toxicidad; la estrategia de evaluación depende en gran medida del uso de relaciones estructura-actividad de las moléculas [NRC, 2007].

Por su parte, el diseño de los programas de pruebas de toxicidad para alimentos y plaguicidas, representan las estrategias de la FDA y USEPA respectivamente, para soportar las

evaluaciones de los compuestos químicos antes de especificar su uso, esto no significa que no puedan ser necesarias otras pruebas como respuesta a objetivos regulatorios con respecto a agentes ambientales; por ejemplo, la USEPA patrocina algunas pruebas de toxicidad, estudios epidemiológicos y desarrollo de otras pruebas para apoyar el cumplimiento de sus reglamentos y leyes en materia de agua potable.

El Programa Nacional de Toxicología (NTP), creado en 1978, coordina a nivel federal todos los programas de pruebas toxicológicas, fortalece las bases de la toxicología, desarrolla y valida métodos de prueba, proporciona información sobre el potencial tóxico de un gran número de compuestos químicos, regula agencias de investigación así como comunidades científicas, médicas y al público, realiza pruebas de toxicidad para compuestos de importancia en salud pública y, su protocolo para bioensayos crónicos se ha convertido en el estándar de oro para probar carcinogenicidad. El Programa ha sido el instrumento para aceptar e integrar nuevas pruebas o enfoque en las estrategias para probar toxicidad, para dar respuesta a las necesidades que representan el creciente número de compuestos químicos nuevos y existentes, y los subproductos de éstos que no han sido probados [NRC, 2007].

5.6.2 CANADÁ

La legislación ambiental canadiense se ocupa de temas básicos y relevantes a escala mundial, nacional y regional, tales como especies en peligro de extinción, pérdida de la biodiversidad, sustancias químicas tóxicas, residuos peligrosos, agotamiento de la capa de ozono, contaminación del aire y el agua, y cambio climático. Así, en Ley de Protección Ambiental Canadiense (CEPA, por sus siglas en inglés), emitida en 1999, se definen un conjunto de criterios para evaluar el potencial que posee una sustancia para persistir, bioacumularse en los organismos vivos y ser tóxica, de tal manera que regula las sustancias tóxicas desde que se originan hasta que se eliminan, esto es a través del ciclo de vida completo [Department of Justice, Canada <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/C-15.31/>].

La instancia responsable del medio ambiente en Canadá, cuenta con el Centro de Ciencias Ambientales de la Región del Atlántico (ESC, por sus siglas en inglés), cuyas instalaciones incluyen entre otros laboratorios, uno para llevar a cabo pruebas ambientales y el de Toxicología, el cual proporciona apoyo para pruebas de toxicidad y asesoramiento a los programas de medio ambiente de Canadá en el Atlántico (NS, NB, PEI y NL). Los principales programas compatibles son: sustancias tóxicas, emergencias (para la aplicación de la Ley de pesca y la CEPA), descargas al mar y evaluaciones ambientales. También proporciona apoyo relacionado con aspectos de toxicidad a otras regiones y otros departamentos del gobierno canadiense a nivel federal y provincial. El laboratorio tiene la capacidad de llevar a cabo una

amplia gama de pruebas de toxicidad aguda y crónica utilizando peces, anfibios, invertebrados, plantas y bacterias. Los métodos de prueba incluyen agua dulce, aguas saladas, suelos, sedimentos, aguas residuales industriales y productos comerciales.

Actualmente, este laboratorio se ha asociado con instituciones como Pesca y Océanos, Hamarus Inc., Unión de Pescadores Marítimos, Instituto de Investigación del Cáncer del Atlántico, la Universidad de Noncton, para determinar los efectos tóxicos asociados con exposiciones crónicas y agudas a niveles bajos (realistas) de plaguicidas y nonilfenol, los efectos medidos incluyen crecimiento, muda, histología, expresión genética (toxicogenómica), conducta y sobrevivencia de larvas de langosta americana (*Homarus americanus*).

Canadá concentra sus esfuerzos y recursos en áreas que no exactamente duplicarían los esfuerzos de otros países con relación al desarrollo de pruebas de toxicidad, específicamente para disruptores endocrinos. Así, el énfasis de la investigación está en determinar la importancia de las pruebas ecotoxicológicas para la mejorar el significado y aplicación en la evaluación de riesgos, ya que hay que relacionar los resultados de pruebas estandarizadas a posibles impactos en el medio ambiente o las poblaciones humanas, especialmente con respecto a los efectos de dosis bajas sobre los organismos en desarrollo [Parrott, *et al.*, 2001].

5.6.3 AUSTRALIA

Australia cuenta con cuatro esquemas de registro y evaluación, definidos por la legislación, los cuales cubren alimentos, químicos industriales, fármacos, agroquímicos y químicos de uso veterinario. Estos esquemas, operan de manera complementaria para evitar duplicidad de cualquier carga regulatoria innecesaria para la industria; son responsabilidad el sector salud y otras instancias gubernamentales, y en ocasiones la responsabilidad se comparte con Nueva Zelanda. Mientras que la cobertura jurisdiccional y la mayoría de funciones de Gobierno se cubren a nivel de Estado o territorio en Australia, la responsabilidad de la evaluación y notificación de los productos químicos es responsabilidad en los niveles de Gobierno Federal. Las agencias reguladoras principales con su legislación específica, se presentan en la Tabla 5.16 [Winder, *et al.*, 2005].

Tabla 5.16. Principales Agencias y leyes para el control de productos químicos

LEY, ESTÁNDAR	AGENCIA FEDERAL RESPONSABLE (SIGLAS EN INGLÉS)
Ley de viene terapéuticos. Estándar de 1989 para uniformar la planeación de fármacos y venenos	Administración de bienes Terapéuticos/ Departamento de Salud Comunitaria y Envejecimiento (TGA/DoHA)
Acta de Productos Químicos Agrícolas y Veterinarios	Autoridad Australiana de Plaguicidas y Medicamentos Veterinarios/Departamento de Agricultura, Pesca y

LEY, ESTÁNDAR	AGENCIA FEDERAL RESPONSABLE (SIGLAS EN INGLÉS)
	Silvicultura de Australia (APVMA/DAFF)
Acta de Estándares para Alimentos de Australia y Nueva Zelanda (1991), Código de Estándares para Alimentos	Estándares para Alimentos de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ)
Código Australiano de Productos Peligrosos	Oficina Federal de Seguridad de Tránsito/ Departamento Comunitario de Transporte (FORS/DoT)
Acta de Químicos Industriales 1989 (notificación y evaluación) (Esquema Nacional de Notificación y Evaluación de Químicos Industriales)	Departamento de Salud Comunitaria y Envejecimiento/ Departamento de Ambiente y Patrimonio/Comisión Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (DoHA/DEH/NOHSC)
Prácticas Comerciales (1974), Acta de Vigilancia de Precios (1983)	Agencia Australiana de Competencia y Consumo (ACCC)

Fuente: Winder, et al., 2005

La oficina de Seguridad Química, el grupo regulatorio de la TGA, dentro del Departamento de Gobierno Australiano de Salud y Envejecimiento, comprende además del NICNAS, la evaluación de riesgos a la salud pública asociados con exposiciones de la población a plaguicidas y medicamentos de uso veterinario entre otros productos químicos. Esta evaluación de riesgos incluye la evaluación de la toxicidad, basada en evidencia.

En 1989-1990, Australia estableció el Esquema Nacional de Notificación y Evaluación de Químicos Industriales (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, NICNAS), dirigido a proteger la salud pública, a los trabajadores y al ambiente, incluyendo la evaluación de productos químicos nuevos y existentes que sean utilizados en su territorio, siendo prioritarios aquéllos productos que son motivo de preocupación ambiental y de salud [<http://www.nicnas.gov.au>]. En 2011 hubo modificaciones y proporciona respaldo legislativo para concluir las reformas reglamentarias para cosméticos, filtros de radiaciones UV en bloqueadores solares entre otros rubros [NICNAS, 2011].

En Australia, los modelos QSAR, no son del todo aceptados para fines regulatorios, aunque los considera una herramienta valiosa cuando son bien aplicados y en ausencia o escasez de evidencia toxicológica generada en estudios *in vivo*. Hacia 2009, NICNAS estaba en proceso de aplicación del modelo QSAR desarrollado en Bourgas, Bulgaria, debido a que considera varios esquemas regulatorios (entre los que cita las agencias de protección ambiental (Estados Unidos, Canadá, Dinamarca, la Comisión Europea) e incorpora parte de las aplicaciones del software de la OECD.

5.6.4 ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y DESARROLLO ECONÓMICOS

De acuerdo con la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE; OECD, por sus siglas en inglés), los agentes químicos juegan un papel muy importante en la vida

diaria, por tanto la seguridad para la vida humana y el ambiente deben ser consideradas cuidadosamente, así, surge el Programa de Químicos, que cumple 40 años en 2011 [OECD, 2011; http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_34365_1_1_1_1_1,00.html]. Desde que inició el Programa, la OCDE ha contribuido al desarrollo y evolución de los enfoques en seguridad química y bioseguridad.

El Grupo de Productos Químicos, fue establecido en 1971, con la finalidad de tratar aspectos de seguridad relacionados con la liberación de compuestos químicos al ambiente y que pudieran dar lugar a resultados inaceptables para el mismo; actualmente los trabajos generados constituyen en el Programa de Medio Ambiente, Salud y Seguridad (EHS, por sus siglas en inglés), que incluye tópicos sobre productos químicos, plaguicidas y biotecnología.

En 1977, se estableció el Programa de Guías de Prueba, en el que el grupo de expertos desarrolló 50 guías de prueba, las cuales fueron acordadas por los miembros en un corto período de tiempo.

Posteriormente, en 1980, los expertos del Grupo de Productos Químicos de la OCDE, organizaron un encuentro al que asistieron varios ministros y funcionarios de alto nivel, en éste, acordaron que las directrices y principios de buenas prácticas de laboratorio (BPL), que habían sido desarrolladas, eran lo suficientemente adecuadas para servir de base para la mutua aceptación de datos en la evaluación de productos químicos (MAD). Al año siguiente, el Consejo de la OCDE confirmó esto mediante la incorporación de este acuerdo vinculándolo jurídicamente con la decisión del Consejo [C (81) 30]. Las directrices y los principios de BPL son parte integrante de la actual Decisión

En 1992, los países miembro establecieron el Programa de Plaguicidas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia y efectividad de su proceso de registro. Como consecuencia, en 1996, se instauró otro programa específico para Biocidas, el cual incluye productos químicos diseñados para destruir organismos indeseables, pero no relacionados con los cultivos, como por ejemplo, desinfectantes y esterilizantes.

La serie de publicaciones incluye guías para el estudio de toxicidad y carcinogenicidad de los plaguicidas:

- Guías para el análisis y evaluación de estudios de toxicidad con dosis repetidas (2000)
- Guías para el análisis y evaluación de estudios de toxicidad crónica y carcinogenicidad (2002)
- La evaluación de la persistencia y bioacumulación en el marco del Registro de Plaguicidas dentro de la Región OCDE (2005)

- Análisis y evaluación de los actuales protocolos para desarrollar métodos de prueba armonizados y estándares de desempeño para probar la eficacia de productos tratados/materiales tratados (2007)

En 1994, la OCDE estableció un grupo para el desarrollo de métodos de evaluación de riesgos ambientales derivados de los productos biotecnológicos modernos, tales como los asociados al consumo de alimentos transgénicos, para la toma de decisiones en el manejo de riesgos.

La validación de los modelos QSAR (modelos cuantitativos de las relaciones estructura-actividad) fue acordada en 2004, siendo la agencia un facilitador en la aceptación de este tipo de modelos para fines regulatorios

En síntesis, dadas las atribuciones de esta Organización, como agencia internacional, la OCDE ha sido el instrumento en el desarrollo de guías para realizar pruebas toxicológicas, internacionalmente aceptadas o armonizadas, lo que implica evitar que los países miembros (actualmente 34) lleven a cabo pruebas de toxicidad similares para un mismo compuesto químico [OECD, 2011].

5.6.5 UNIÓN EUROPEA

En 1967, nació en Europa el derecho europeo sobre productos químicos. La Política de la Unión Europea cambió en septiembre de 1981, fecha a partir de la cual se empezaron a clasificar las sustancias químicas que aparecían como sustancias nuevas, con un número ELINCS (European List of Notified Chemical Substances), de las que se requería información sobre sus propiedades intrínsecas. La Directiva 67/548/CEE exigía que las sustancias nuevas se sometieran a ensayos y que se determinaran los posibles riesgos para la salud humana o el medio ambiente antes de su comercialización, cuando se produjeran más de 10 Kg. Para volúmenes superiores obligaba a realizar ensayos sobre efectos crónicos y a largo plazo. Posteriormente, en 1993, se emite la Reglamentación sobre evaluación de sustancias existentes y de elabora un listado de sustancias prioritarias.

La Unión Europea (UE) ha modernizado la legislación europea en materia de sustancias químicas y ha creado el sistema REACH, que entró en vigor el 1 de junio de 2008. El sistema integrado de registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas, está dirigido a mejorar la protección de la salud humana y del medio ambiente manteniendo al mismo tiempo la competitividad y reforzando el espíritu de innovación de la industria química europea. También se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, con la misión de gestionar día a día las exigencias relativas a REACH.

El ámbito de aplicación del Reglamento abarca todas las sustancias fabricadas, importadas, comercializadas o utilizadas, como tales o en forma de mezclas, excluyendo del Reglamento las siguientes:

- Sustancias radiactivas (cubiertas por la Directiva 96/29/Euratom)
- Sustancias que se encuentran sometidas a supervisión aduanal y que están en depósito temporal, en una zona franca o en un depósito franco con el fin de volverse a exportar, o en tránsito
- Sustancias intermedias no aisladas
- El transporte de sustancias peligrosas, y
- Residuos

Además, las normas relativas al registro, a los usuarios finales, a la evaluación y a la autorización no se aplicarán a las sustancias utilizadas en los medicamentos para uso humano o veterinario, ni a los productos alimentarios ni a los piensos (incluidos los aditivos) siempre que se incluyan en el ámbito de aplicación de la normativa comunitaria en materia de medicamentos o alimentos.

REACH obliga a las empresas que fabrican e importan sustancias y preparados químicos a evaluar los riesgos derivados de su utilización y a adoptar las medidas necesarias para gestionar cualquier riesgo identificado. La carga de la prueba de la seguridad de las sustancias y preparados químicos fabricados o comercializados recae en la industria.

Asimismo, el registro exige que la industria (fabricantes e importadores) proporcione información relativa a las propiedades, utilizaciones y precauciones de uso de las sustancias químicas (expediente técnico). Los datos requeridos son proporcionales a los volúmenes de producción y a los riesgos presentados por la sustancia (por ejemplo, pruebas amplias de toxicidad relativas a las sustancias fabricadas o importadas en cantidades superiores a 1000 toneladas). Por otra parte, las solicitudes de registro referentes a sustancias importadas o fabricadas en cantidades de 10 toneladas anuales o superiores deben enumerar los riesgos vinculados a estas sustancias, así como los diferentes escenarios de exposición posibles y las medidas de gestión de estos riesgos (informe sobre la seguridad química).

La evaluación, obligatoria en el Reglamento, permite a la Agencia comprobar que la industria cumple sus obligaciones y evita los ensayos innecesarios con animales vertebrados y prevee tanto la evaluación del expediente y como la evaluación de la sustancia. [UE, 2011; http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/]

Anterior al REACH, en julio de 2002, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, elaboró una lista de 13 ensayos que no necesitarían el recurso a la experimentación animal y que serían técnicamente aplicables en 2003 en el marco de los estudios de prevalidación y de validación, que incluían ensayos *in vitro* y el uso de modelos QSAR [DOUE, 2003], así, son considerados válidos en el marco del REACH, sólo para sustituir las pruebas con animales si se ha establecido que son científicamente válidos y el método está adecuadamente documentado.

En 2009, El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, por sus siglas en inglés), que forma parte del Centro Común de Investigación (CCI) de la Comisión Europea, y sus homólogos en los Estados Unidos (ICCVAM)⁶, Japón (JACVAM)⁷ y Canadá (*Environmental Health Science and Research Bureau*) firmaron un acuerdo de cooperación dirigido a impulsar la expansión a escala mundial, alternativas científicamente probadas a los métodos de ensayo con animales, para probar la toxicidad de sustancias químicas.

5.6.6 EL USO DE SARs Y QSARs CON FINES REGULATORIOS

Cronin, et al [2003^a y 2003^b], hace un amplio y detallado análisis del uso de los modelos SAR y QSAR para la predicción de los efectos ambientales y a la salud pública, asociados a compuestos químicos que se producen en grandes volúmenes. De acuerdo con los autores, no hay una guía específica del uso de estos modelos con fines regulatorios, pero p. ej., el manual sobre el Conjunto de Datos e Información para Tamizaje (Screening Information Data Set, SIDS) [OECD 2002], es de utilidad, ya que constituye principalmente, una serie de citas de otros documentos de la OCDE que soportan la toma de decisiones, y si bien no hay ninguna guía específica para el uso de SAR en la evaluación de la toxicidad en mamíferos, el documento enumera algunos ejemplos de la utilización potencial de SAR: grupos de isómeros con perfiles similares de SAR; homólogos cercanos, así como información disponible sobre productos de degradación y metabolitos para productos químicos específicos [Cronin, *et al.*, 2003a].

A nivel global, las agencias regulatorias han establecido un marco de referencia para el uso de los modelos QSARs dirigidos a la protección de la salud humana (Tabla 5.17), pero aún es

⁶ ICCVAM = Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

⁷ JACVAM = Japanese Center for the Validation of Alternative Methods del National Institute of Health Sciences, que forma parte del Ministerio japonés de Sanidad, Educación y Previsión.

necesario difundir y fortalecer su uso. Este es un punto importante, ya que es evidente la necesidad de evaluar en poco tiempo, los riesgos asociados a un gran número de compuestos químicos que son continuamente liberados al ambiente.

Tabla 5.17. Marco del uso de los modelos QSAR con fines regulatorios para predecir efectos a la salud humana

TOXICIDAD	ATSDR ¹	USEPA ²	USFDA ³	ITC ⁴	NCI ⁵	USNTP ⁶	NIOSH ⁷	D EPA ⁸
Aguda		S		S				
Irritación		S		S				Q
Sensibilización		S		S				
Absorción dérmica		S		S				Q
Subcrónica				Q			Q	
Crónica		S		S				
Reproductiva		Q		Q		S		
Del desarrollo		S		S		S	S	
Mutagenicidad	Q	S		S		S		
Carcinogenicidad	Q	S		S	S	S		Q
Inmunotoxicidad	Q	S	Q	S	S			Q
Neurotoxicidad		S		S				

Abreviaciones: Q, uso de QSARs; S, uso de SARs., 1) Agencia para el Estudio y Registro de la Sustancias Tóxicas; 2) Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos; 3) Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos; 4) Comité de Integración de Pruebas; 5) Instituto Nacional del Cáncer; 6) Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos; 7) Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional; 8) Agencia de Protección Ambiental de Dinamarca

Fuente: tomada de Cronin, et al., 2003^a

Con respecto a los efectos ecológicos y destino ambiental de las sustancias químicas, por muchos la USEPA ha sido la agencia reguladora que más uso ha hecho de los modelos QSAR para este fin; no obstante, cada vez un mayor número de países están utilizando esta herramienta, desarrollando y validando modelos para predecir efectos ecológicos y la distribución de contaminantes en los diferentes compartimientos ambientales, es de esperarse, que dicha práctica continuará creciendo, principalmente a la luz de los actuales desarrollos tecnológicos y necesidad de evaluar un gran número de compuestos químicos en poco tiempo.

Como ya se anotó con anterioridad, el uso de los modelos QSAR, es mejor aceptado cuando no se tiene información experimental acerca de la toxicidad de una sustancia, en Europa, esto fue una estrategia básicamente con la finalidad de manejar sustancias persistentes, bioacumulativas y tóxicas, así como muy persistentes y altamente bioacumulativas, bajo criterios específicos, como se presenta en la Tabla 5.18.

Tabla 5.18. Criterios de identificación de sustancias persistentes, bioacumulativas y tóxicas (PBT) y muy persistentes y muy bioacumulativas (vPvB)

CRITERIO	PBT	vPvB
Persistencia	Vida media >60 días en agua marina o >40 días en agua dulce, o vida media >180 días en sedimento marino o > de 120 días en sedimento de agua dulce	Vida media >60 días en agua marina o dulce, o vida media >180 días en sedimento marino o de agua dulce
Bioacumulación	Factor de bioacumulación >2,000	Factor de bioacumulación >5,000
Toxicidad	NOEC<0.01 mg/L o efectos carcinogénicos, mutagénicos, reproductivos o disrupción endocrina	No aplica

La USEPA, ha desarrollado técnicas de estimación de efectos tóxicos específicos para organismos acuáticos (peces, invertebrados y algas) mediante QSARs desde 1979 [Cronin, *et al.*, 2003b]. Estos QSARs han sido incorporados en el software ECOSAR, que utiliza el peso y estructura molecular del compuesto, así como el log del coeficiente de partición octanol/agua para predecir toxicidad acuática. Las predicciones se basa en datos reales de al menos un miembro de la clase química. Los datos (valores de toxicidad medida) se correlacionan con el Kow para derivar una ecuación de regresión que puede ser usada para predecir la toxicidad acuática de otra molécula semejante en la misma clase química. Este programa es continuamente actualizado, se encuentra disponible en la página de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, sin costo alguno. El uso de estos modelos para fines regulatorios, también ha ido en aumento en diferentes regiones del mundo (Tabla 5.19).

Tabla 5.19. Uso de QSARs para predicción de transformación y destino ambiental con fines regulatorios

	ATSDR	USEPA	ITC	D EPA	HEALTH CANADA	UNIÓN EUROPEA
Toxicidad acuática		Q	Q	Q	Q	Q
Toxicidad bentónica			S			
Koc		Q	Q	Q	Q	Q
Kow	Q	Q	Q	Q	Q	Q
Punto de fusión			Q			
Volatilización			Q			
Solubilidad en agua		Q	Q		Q	
Factor de bioconcentración		Q	Q			
Biodegradación		S	S			
Hidrólisis			Q			

Abreviaciones: Q, uso de QSARs; S, uso de SARs
Fuente: tomada de Cronin, et al., 2003b

5.7 FUENTES DE INFORMACIÓN Y BASES DE DATOS PARA LA MODELACIÓN PREDICTIVA

Todos los procesos de modelación requieren datos; en el caso de la toxicología predictiva, esto inicia poniendo la información y datos toxicológicos en los modelos. A continuación, se listan algunas de las fuentes de información disponibles a través de diferentes recursos y herramientas, dicha información fue tomada de Cronin [2009b], quien hace una detallada revisión de las herramientas disponibles para el caso de compuestos químicos peligrosos. En la Tabla 5.20 se presenta un listado de las bases de datos que tienen potencial para su uso en la toxicología *in silico*. En seguida, se listan y describen brevemente los principales sistemas expertos (Tabla 5.21) y herramientas de programación para el mismo fin (Tabla 5.22).

Tabla 5.20. Bases de datos de toxicidad con potencial para uso en la toxicología *in silico*

TIPOS DE BASE DE DATOS	EJEMPLOS ILUSTRATIVOS Y REFERENCIAS	COMENTARIOS
Conjunto de datos de literatura en particular	Datos de sensibilidad de la piel de una fuente en particular para la prueba de maximización de conejillo de Indias.	Son frecuentemente conjuntos de datos de alta calidad así que podrían haber sido medidos en el mismo laboratorio, y aún por el mismo procedimiento y/o operadores. Son probablemente pequeños, pero podrían ser altamente adecuados para modelo (local)
Recopilación de literatura	Base de datos de sensibilidad de la piel de información de ensayos de nodo linfático local histórico de varios laboratorios (14); Base de datos de potencia carcinogénica (CPDB) (http://potency.berkeley.edu/)	La disposición de estas bases de datos proveería un buen punto de partida para estudios de modelos. Los datos son usualmente de una prueba o protocolo particular, pero variarían en consistencia así que son medidos en diferentes laboratorios.
Recopilación de acceso libre de información de toxicidad	ToxNet http://toxnet.nlm.nih.gov/ ; AMBIT http://ambit.acad.bg/ambit/php/	Bases de datos grandes cubren muchos puntos finales y efectos. La mayoría de los datos será de calidad variable e incluiría efectos no estandarizados
Bases de datos a detalle (y por lo tanto potencialmente de mayor calidad)	DSSTox http://www.epa.gov/ncct/dsstox/index.html . Otras bases de datos están disponibles de proyectos cooperativos tales como Proyectos del sistema de la Unión Europea, e. g., el proyecto CAESAR (http://www.caesar-projects.eu/)	Bases de datos bien estructuradas en términos de revisión de estructura química e información y calidad de datos. Estas están libremente disponibles y son puntos de partida ideales para modelar

TIPOS DE BASE DE DATOS	EJEMPLOS ILUSTRATIVOS Y REFERENCIAS	COMENTARIOS
Bases de datos desarrolladas para propósitos de regulación	Sistemas de Información de sustancias químicas europeas (ESIS) http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/	Colecciones de información toxicológica y datos relacionados a sustancias (usualmente químicos industriales). La calidad de la información no es necesariamente revisada para ingresar a la base de datos
Base de datos comerciales	Bases de datos Leadscope (incluyen FDA) (http://www.leadscope.com/); base de datos VITIC de Lhasa Ltd. (http://www.lhasalimited.org)	Son frecuentemente grandes bases de datos con muchos compuestos, una amplia variedad de química y un número de efectos diferentes. Modeladores necesitarán determinar la propiedad de los datos y la información que contengan antes de reproducir los datos en un modelo publicado
Bases de datos corporativas y/o reservadas	Algo de información y/o datos están disponibles abiertamente en sitios de red corporativos, p. ej., de las compañías farmacéuticas – estas pueden ser alcanzadas para hojas de datos de material de seguridad (MSDS). MSDS puede también encontrarse de otros proveedores químicos (p. ej., Sigma Aldrich – http://www.sigmaaldrich.com) Otros bases de datos corporativas no están abiertamente disponibles y son usadas como herramientas de búsqueda. Estas variarían en tamaño y calidad y aún si existen en una forma computarizada o no.	Existe gran información en proveedores químicos o bases de datos farmacéuticos. Serían difíciles de usar una vez que la entrada fuera para sustancias particulares. Detalles en el procedimiento de la prueba no estarían disponibles. Para algunas sustancias, p. ej., farmacéuticas, un resultado de la prueba no estaría disponible, el registro declararía simplemente la probable presencia de una toxicidad

Tabla 5.21. Una lista no exhaustiva de sistemas expertos para predecir toxicidad

SISTEMAS EXPERTOS (Y DISTRIBUIDOR)	DESCRIPCIÓN	PRINCIPALES (INDICATIVO) EFECTOS ABARCADOS	INFORMACIÓN ADICIONAL Y/O REFERENCIA
DEREK para Windows (Lhasa Ltd, Leeds, England)	Un sistema experto de conocimientos creado con conocimientos de relaciones estructura-toxicidad. El programa contiene más de 500 alertas estructurales e información de soporte	Carcinogenicidad, mutagenicidad, genotoxicidad, sensibilidad de la piel, teratogenicidad, irritabilidad, sensibilidad respiratoria, hepatotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad ocular	Http://www.lhasalimited.org/index.php?cat=2&sub_cat=64
EPISuite (libremente disponible de	Una serie de programas que integran un número de modelos de estimación	Principalmente efectos ambientales, además incluye un algoritmo de penetración dermal	http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm

SISTEMAS EXPERTOS (Y DISTRIBUIDOR)	DESCRIPCIÓN	PRINCIPALES (INDICATIVO) EFECTOS ABARCADOS	INFORMACIÓN ADICIONAL Y/O REFERENCIA
Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos)	para la predicción de propiedades ambientales y físicas/químicas	(DERMWIN) el cual calcula el coeficiente de permeabilidad en la piel; dosis absorbida dermalmente por evento	
HazardExpert Pro	Un programa basado en reglas para la predicción de toxicidad usando fragmentos estructurales. El programa incorpora una consideración de biodisponibilidad vía el cálculo de log P y pK _a	Oncogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, irritación de membrana, sensibilización, inmunotoxicidad neurotoxicidad	http://www.comudrug.com/
LAZAR	Una aproximación de fragmento	Toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad de Hígado	http://www.in-silico.de/
MC4PC	Un algoritmo basado estadísticamente en fragmentos que codifican características que promueven toxicidad (toxicoforos) y desactivación (toxicofobias)	Superior a 180 módulos (i.e., efectos individuales) incluye aquellos para los siguientes efectos: toxicidad aguda en mamíferos; efectos adversos en humanos; carcinogenicidad; citotoxicidad; toxicidad desarrollada; teratogenicidad, toxicidad genética, irritación en piel y ojos, alergias	http://www.multicase.com
Oncologic	Aplicación de análisis SAR e incorporación de conocimientos de los mecanismos de acción y estudios epidemiológicos humanos	Cáncer	La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha recientemente comprado el derecho a el sistema y es comúnmente actualizado para la distribución libre al público (más detalles de Dr Yin-tak Woo; e-mail: woo.yintak@epa.gov)
OSIRIS Explorador de propiedades	Programa de Internet libremente disponible donde las predicciones son realizadas de fragmentos estructurales	Mutagenicidad, tumorigenicidad, irritación y efectos reproductivos	http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/
PASS	Predicir actividad de la estructura	Una amplia variedad de efectos relevantes a la toxicidad, particularmente aquellos basados en efectos mediante receptores	http://195.178.207.233/PASS/index.html

SISTEMAS EXPERTOS (Y DISTRIBUIDOR)	DESCRIPCIÓN	PRINCIPALES (INDICATIVO) EFECTOS ABARCADOS	INFORMACIÓN ADICIONAL Y/O REFERENCIA
TIMES-SS (Laboratorio de química matemática, Universidad "Prof. Assen Zlatarov", Bourgas, Bulgaria)	Un sistema experto en híbrido codifica relaciones de estructura-metabolismo y toxicidad-estructura	Sensibilidad de piel, mutagenicidad, aberración cromosomal y estrógeno, y receptor andrógeno enlazado a afinidades de químicos	http://oasis-lmc.org/?section=software&wid=10
TOPKAT	QSAR's estadístico basado en análisis de regresión y discriminación de descriptores 2D, utilizando conjuntos de datos heterogéneos grandes	Carcinogenicidad de roedor, mutagenicidad de Ames. Dosis letal 50 vía oral para rata, LOAEL crónico en rata, desarrollo de toxicidad potencial, sensibilidad de la piel, dosis máxima tolerada en rata, irritabilidad en ojos y piel, concentración letal 50 de toxicidad de inhalación en rata, y dosis máxima tolerada en rata	http://accelrys.com/products/discovery-studio/toxicology/
ToxTree	Grupos químicos y predicción de varios tipos de toxicidad basados en aproximaciones del árbol de decisión	Esquema de clasificación de Cramer, reglas BfR para predecir irritación de piel y ojos y corrosión, y la base de reglas de Benigni-Bossa para mutagenicidad y carcinogenicidad	http://ecb.jr.ec.europa.eu/qsar/qsar-tools/index.php?c=TOXTREE
TerraQSAR-Skin	Programa de red neutral para calcular el potencial de irritación de la piel de químicos orgánicos para los conejos (pruebas de Draize)	Irritación de la piel	http://www.terrabase-inc.com/

Tabla 5.22. Algunas herramientas de programación disponibles para formar categorías químicas

SISTEMA EXPERTO (Y DISTRIBUIDOR)	DESCRIPCIÓN	APROXIMACIÓN A AGRUPACIÓN QUÍMICA	INFORMACIÓN ADICIONAL Y/O REFERENCIA
AMBIT (desarrollado por IdeaConsult Ltd, Sofía, Bulgaria)	Bases de datos químicas públicamente disponibles y herramientas funcionales, incluyendo una herramienta para definir el dominio de aplicabilidad de modelos QSAR. Contiene más de	Interpreta agrupaciones y evalúa el dominio de aplicabilidad de un QSAR que ofrece una variedad de métodos que incluyen: aproximaciones estadísticas que dependen de la "calidad	http://ambit.acad.bg

SISTEMA EXPERTO (Y DISTRIBUIDOR)	DESCRIPCIÓN	APROXIMACIÓN A AGRUPACIÓN QUÍMICA	INFORMACIÓN ADICIONAL Y/O REFERENCIA
	450,000 registros para químicos individuales. Búsqueda de Estructura química y fragmento	del descriptor"; aproximaciones basada en entendimientos de mecanismos; y en similitud estructural	
Método de identificación análoga (AIM) (desarrollado de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)	Una red libremente disponible, herramientas computarizadas que identifican análogos químicos basados en estructura. La base de datos AIM contiene 31,031 análogos potenciales con datos de toxicidad disponibles públicamente	El uso de un fragmento químico aproximadamente con 645 fragmentos químicos individuales para identificar los análogos potenciales	http://www.epa.gov/oppt/sf/tools/methods.htm#new
Leadscope (desarrollado por Leadscope Inc.)	Un manejo de datos y herramientas de extracción de éstos; es posible importar conjunto de datos adicionales y realizar comparaciones con base de datos existentes que contienen información toxicológica	Basado en 27,000 compuestos químicos marcados. Existen algoritmos estadísticos que son también incluidos para facilitar funcionalidades tales como agrupación de químicos y datos, extracción de reglas estructurales, desarrollo de modelos QSAR también como desarrollo de categorías químicas Desarrollo de modelos QSAR también como el desarrollo de categorías químicas	http://www.leadscope.com
OECD (Q) SAR Aplicación de caja de herramientas (desarrollado por la Organización para el desarrollo y Cooperación económica)	Una red disponible libremente, herramientas que proveen un flujo para la formación de categoría. La caja de herramientas contiene base de datos con resultados de estudios experimentales; una biblioteca de modelos QSAR; herramientas para estimar la pérdida de valores experimentales transversales y análisis de tendencia	Las categorías son formadas a partir de análogos estructurales, mecanismos o modos de acción, i.e., proteína o enlaces de DNA	http://www.oecd.org - buscar "QSAR" en el sitio web OECD
ToxMath (desarrollado por	Un programa libremente disponible el cual tiene la	Varios índices de similitud química facilitan la	http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar-tools/index.php?c=

SISTEMA EXPERTO (Y DISTRIBUIDOR)	DESCRIPCIÓN	APROXIMACIÓN A AGRUPACIÓN QUÍMICA	INFORMACIÓN ADICIONAL Y/O REFERENCIA
Ideaconsult Ltd, Sofía, Bulgaria)	habilidad de comparar conjuntos de datos basados en varios índices de similitud de descriptor y estructura, así como los promedios para calcular similitudes pareadas entre compuestos o agregados similarmente de un compuesto a un conjunto	agrupación de químicos	TOXMATH

En la página web de la Asociación Española de Toxicología, AETOX, [<http://www.uv.es/aetoxweb/grupos/gtema/gtema.inv.html>], hay un listado de sitios web, bases de datos sobre métodos alternativos a los ensayos con animales, simulación en línea, reducción y refinamiento, así como regulaciones

5.7.1 EL PROGRAMA TOXCAST DE LA USEPA

Una prueba de la aplicación de la química computacional, tecnología de alto rendimiento y varias tecnologías toxicogenómicas (Tabla 5.23), para el tamizaje en la evaluación de riesgos toxicológicos, es el programa ToxCast de la USEPA. El objetivo del programa es obtener con un bajo costo y poco tiempo información para predecir los riesgos toxicológicos potenciales de los químicos ambientales para los humanos y mediante la priorización, dirigir los recursos limitando las pruebas a aquellos compuestos químicos que representan el mayor peligro para la salud pública y el ambiente [Dix, *et al.*, 2007].

Tabla 5.23. Ejemplos de tamizaje biológico y quimiinformática relevantes para el programa ToxCast

APROXIMACIÓN	DESCRIPCIÓN
Tecnología de tamizaje de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés)	NIH Iniciativa de biblioteca molecular, extiende el uso de pruebas de pequeñas moléculas para investigación biológica BioMAP basa en el perfil de actividad de aproximadamente 100 drogas en ensayos basados en células diseñado para incorporar complejidad biológica Espectro de actividad biológica para 1567 compuestos (principalmente drogas) basado en la interacción de ensayos con 92 ligandos de unión Utilería del espectro de actividad biológica para predecir efectos adversos inducidos por fármacos Efectos de 1,400 inhibidores de actividad kinasa en un panel de 35 ensayos celulares tirosina kinasa-dependientes en formato dosis-respuesta Tamizaje de alto contenido de >600 compuestos en células HepG2

APROXIMACIÓN	DESCRIPCIÓN
	<p>demonstraron toxicidad en humanos con 80% de sensibilidad y 90% de especificidad</p> <p>Cambios en la expresión de genes correlacionados con patrones de actividad de fármacos en 60 líneas de células humanas- uno de los primeros sistemas que integraron grandes cantidades de datos farmacológicos y genómicos</p> <p>Aplicaciones de HTS a descubrimientos agronómicos</p> <p>Ensayos HTS para el desarrollo de nuevos herbicidas, insecticidas y fungicidas, incluyeron el uso de tecnologías capaces de evaluar más de 200,000 químicos al año</p> <p>Combinación de HTS con información biocinética básica para mejorar la identificación de compuestos químicos</p>
Bases quimioinformáticas	<p>Iniciativas públicas para acelerar la integración de información biológica diversa con estructuras químicas estandarizadas</p> <p>Estrategia para integrar bases de datos de estructuras químicas a respuestas biológicas determinadas</p>
Estudios estructura actividad (SAR)	<p>Datos públicos sobre 1750 moléculas para computar modelos en serie que predicen inhibición de CYP2D6 y CYP3A4</p> <p>Datos para 58,963 compuestos en humanos relacionados con canales de genes y 2,410 compuestos para inhibición de CYP2D6, combinados para obtener un modelo predictivo de toxicidad</p> <p>Predicción del espectro de actividad de sustancias para un total de 565 eventos respuesta, que resultan en 64 millones de predicciones sobre aproximadamente 25,000 químicos en la Base de Datos Abierta del Instituto Nacional del Cáncer, utilizados para seleccionar compuestos a ser probados</p>

Fuente: tomada de Dix, *et al.*, 2007

La hipótesis que subyace en ToxCast es que la respuesta toxicológica está dada por interacciones entre los compuestos químicos y moléculas biológicas blanco. En la mayoría de los casos, estos blancos son parte del proteoma celular (p. ej., receptores, canales de iones, kinasas). Sin embargo, para la mayoría de los químicos ambientales las proteínas blanco y los efectos biológicos suponen que los efectos adversos potenciales han sido definidos o caracterizados.

Debido a que los ensayos adecuados para esta búsqueda no están disponibles o es difícil conseguirlos, la meta en toxicología ambiental va hacia una aproximación más global del perfil de actividad biológica, de tal manera que el programa se enfoca en una matriz de múltiples blancos. Esta matriz contiene un número expandido de blancos potenciales cuyas interacciones químicas pueden ser caracterizadas por modelos *in silico*, ensayos bioquímicos, ensayos *in vitro* y modelos animales no-mamíferos [Dix, *et al.*, 2007].

Lo anterior es importante, porque se estima, en Estados Unidos, que hay 10,000 o más compuestos químicos ambientales incluidos en varios programas que necesitan ser clasificados

y priorizados para futuras pruebas, que incluyen plaguicidas activos, compuestos inertes en los plaguicidas, químicos que se producen en grandes volúmenes y químicos que se encuentran en la lista de contaminantes candidatos de agua para consumo humano (Fig. 5.21), para los cuales generalmente la información toxicológica es insuficiente o inadecuada para su aplicación en la evaluación de los peligros y riesgos a la salud.

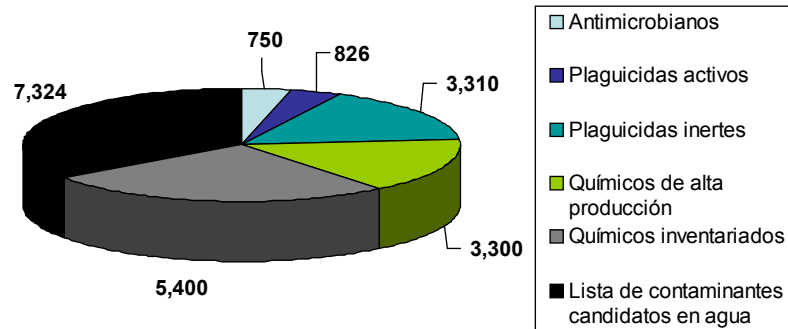


Fig. 5.21. Químicos ambientales que presentan retos de priorización para las agencias regulatorias ambientales [Dix, et al., 2007]

ToxCast está diseñado para el dominio público de múltiples datos de relevancia biológica y alto costo experimental, de *in vitro* a *in silico*, y quizá a *in vivo* con modelos animales no mamíferos (Fig. 5.22).

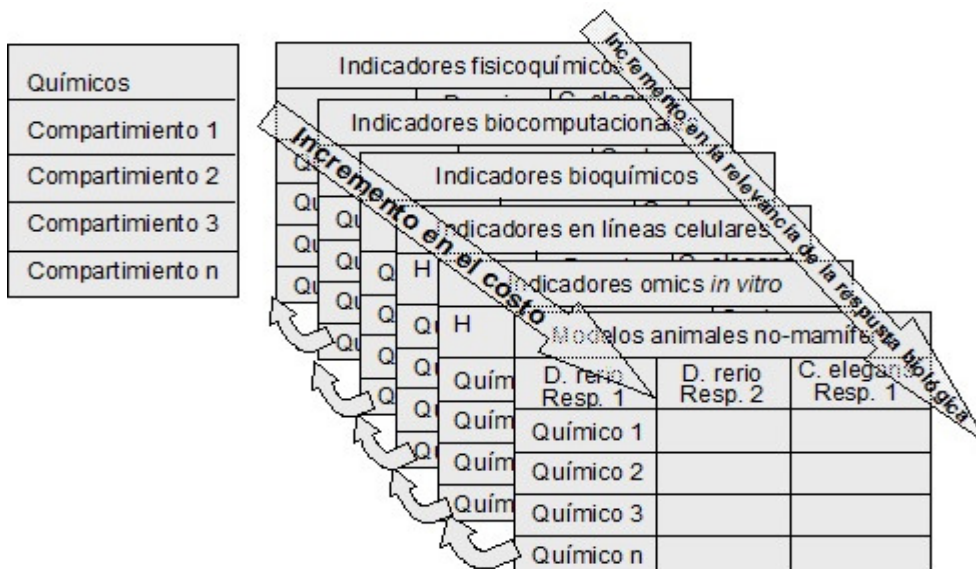


Fig. 5.22. Los dominios de datos múltiples que incluye el programa de investigación ToxCast, a través de un continuo desde los modelos *in silico* a los modelos *in vitro* e *in vivo* [Dix, et al., 2007]

Las asociaciones entre los dominios de los datos a través de los químicos, puede ser hecha con el objeto de generar marcas o huellas de bioactividad y agrupar los compuestos en compartimientos. Estos son patrones más grandes y complejos de perfiles de bioactividad a través de un amplio rango de ensayos que pueden estar asociados con cualquier estructura química, o bien con toxicidad conocida de químicos de referencia. Esto es, asociaciones o correlaciones entre estructura química, perfil de bioactividad y la toxicidad resultante, que puede ser derivada mediante el poder predictivo de ToxCast.

En el curso del tamizaje para la identificación de blancos o ensayos adecuados para ToxCast (Tabla 5.24), los dos puntos clave son la factibilidad económica y técnica para rastrear estos blancos o ensayos para miles de compuestos químicos, minimizando resultados falsos negativos y, relacionando los peligros para la salud humana con los ensayos disponibles en fuentes de información confiables, ya que la mayoría de los datos en el programa proceden de diversas series y diferentes tipos de ensayos que colectivamente evalúan un amplio espectro de actividades biológicas, lo cual eventualmente requiere el manejo de bibliotecas de compuestos químicos ambientales y herramientas informáticas especializadas (química y biología) para identificar asociaciones significativas de datos.

Tabla 5.24. Ensayos y criterios de selección para ToxCast

ENSAYOS	QUÍMICOS
Capacidad para miles de compuestos químicos	Perfeccionar, calidad y relevancia de datos toxicológicos
Amplio espectro de genes, proteínas y metabolitos	Uso en otras pruebas de toxicidad
Optimización de HTS o tecnologías omics	Peso molecular, solubilidad, coeficientes de partición adecuados para HTS
Ligas para conocer modo de acción (MOA) toxicológica	Rango de toxicidades, modos de acción
Si es ensayo <i>in vivo</i> , uso de modelos animales no-mamíferos	Clases estructurales de compuestos químicos, y suficientes miembros para agrupar en clases por tipo de análisis
Capacidad para probar concentración-respuesta	Uso de clases de químicos
Capacidad metabólica	Papel del metabolismo en la toxicidad
Mínimo número de falsos negativos Disponibles	Pureza confiable, formas enantioméricas disponibles

Fuente: tomada de Dix, et al., 2007

5.7.2 PROGRAMA OPENTOX

El programa OpenTox es un marco de trabajo interpolable, dirigido a soportar el manejo de datos de toxicología predictiva, algoritmos, modelación, validación y reporte. En Europa, es considerado un herramienta importante, debido a que en este momento es el programa que satisface los requerimientos de evaluación de seguridad química establecido en el REACH, ya que tiene acceso a datos experimentales, modelos QSAR, así como información toxicológica disponible a través de una plataforma integral que cumple con los principios regulatorios y de validación de la OCDE.

El objetivo de OpenTox, es de largo plazo y pretende desarrollar un marco de trabajo de toxicología predictiva, que contenga una colección de herramientas interpolables que incluyan: estado del arte de los modelos QSAR, quimioinformática, bioinformática, estadística y minería de datos, algoritmos y modelos de química y biología computacionales, fuentes de datos *in vitro* e *in vivo* integrables, ontologías e interfaces gráficas amigables para los usuarios.

Así mismo, el programa constituye un soporte para expertos en toxicología sin expertís en metodología *in silico*, así como a los desarrolladores de modelos y algoritmos. Hardy, *et al.* [2011], describen el programa y en la página web [<http://www.opentox.org/>], se encuentran los tutoriales para la instalación y uso libre (Fig. 5.23). El único requisito es registrarse y aceptar las condiciones de uso, bajo licencia.

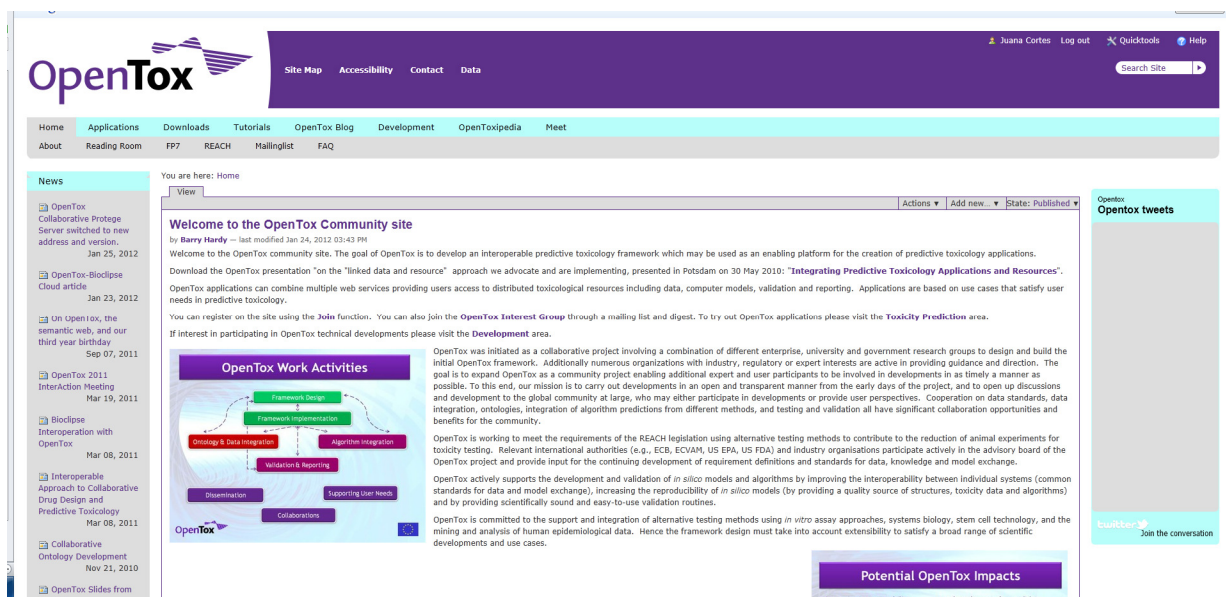
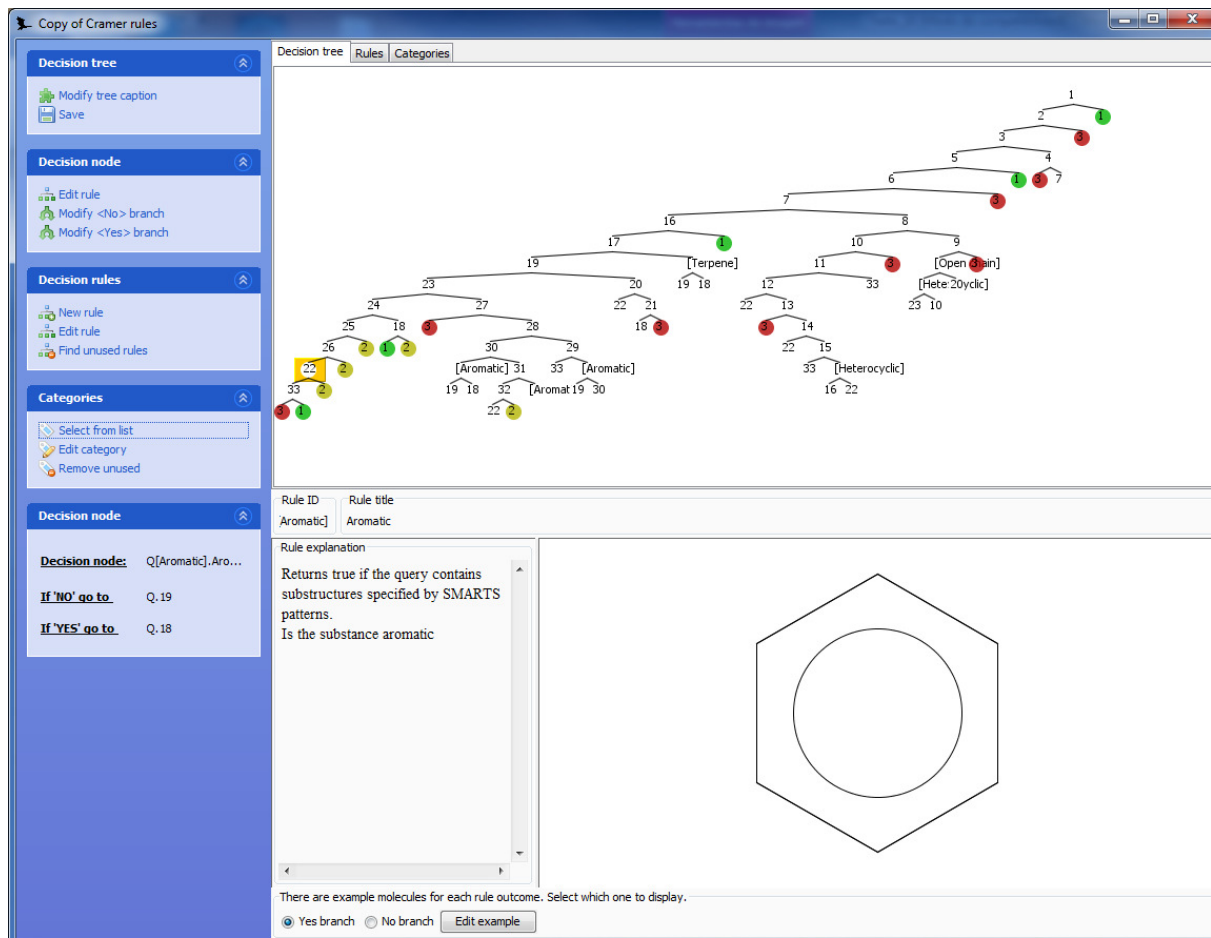


Fig. 5.23. Sitio web del programa OpenTox [<http://www.opentox.org/>]

5.7.3 TOXTREE

ToxTree es una herramienta amigable, de acceso libre, que permite estimar toxicidad de una molécula mediante aproximación con un árbol de decisión (Fig. 5.24).



The screenshot displays the ToxTree decision tree interface. The main window shows a tree structure with nodes numbered 1 through 33. Nodes are color-coded: red (Class III), yellow (Class II), and green (Class I). The tree branches based on chemical features like 'Terpene', 'Open chain', 'Heterocyclic', and 'Aromatic'. A detailed view of a rule is shown at the bottom, for example, 'Aromatic' with a rule explanation and a benzene ring structure.

Fig. 5.24. Árbol de decisión en Toxtree. Los círculos rojo indican Tóxico clase III (muy tóxico), el amarillo tóxico clase II (toxicidad media) y el verde tóxico clase I (toxicidad baja)

Actualmente incluye los siguientes módulos

1. Reglas de Cramer [CRA78]
2. Esquema Verhaar para predecir mecanismos de acción tóxica [VER92]
3. Árbol de decisión para estimar irritación de la piel y corrosión potencial, basado en reglas publicadas [WAL05]
4. Árbol de decisión para estimar irritación de los ojos y corrosión potencial, basado en reglas publicadas [GER05]

5. Árbol de decisión para estimar carcinogenicidad y mutagenicidad [BEN07], [BEN08]

El programa puede ser aplicado a un conjunto de datos de varios archivos compatibles. El usuario define la estructura molecular, o bien incluir el SMILES o construir la molécula en 2D con el editor de diagrama (Fig. 5.25). La construcción de la molécula se basó en los cromatogramas obtenidos en el laboratorio, así como en el uso de herramientas como EPISUIT, Toxchem, Toxnet y Spider.

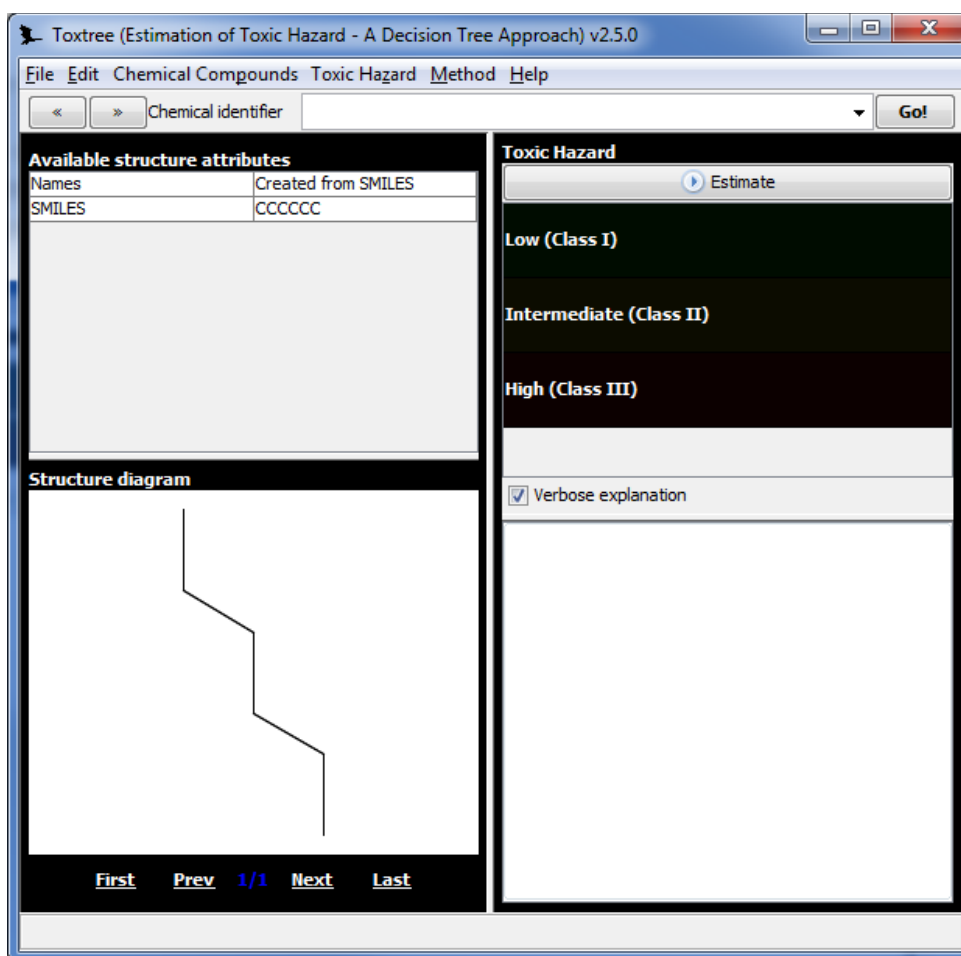


Fig. 5.25. Módulo para introducción de la molécula cuya peligrosidad se desea conocer

Toxtree ha sido diseñado con capacidades flexibles para futuras ampliaciones (por ejemplo, otros esquemas de clasificación que podrían desarrollarse en el futuro). Nuevos árboles de decisión con reglas arbitrarias pueden construirse con la ayuda de la interfaz gráfica de usuario o mediante el desarrollo de nuevos complementos. Entre las fortalezas de ToxTree, está la

ausencia de sesgos. Las reglas predefinidas se basan en publicaciones, no involucra la fase de aprendizaje o selección de alguna función.

5.7.4 IDENTIFICACIÓN DE LA PELIGROSIDAD DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PRESENTES EN AGUA SUBTERRÁNEA INFLUIDA POR EL USO DE AGUAS RESIDUALES EN EL RIEGO AGRÍCOLA

La presente información no tiene más objetivo que ilustrar el hecho de que mediante ToxTree y OpenTox, fue posible identificar la peligrosidad de los compuestos orgánicos detectados en fuentes de abastecimiento de agua subterránea influida por la recarga a través de riesgo agrícola con aguas residuales crudas y parcialmente tratadas (Tabla 5.25). Para algunos de estos compuestos, fue necesario editar la molécula (Tabla 5.26), como se ejemplifica en la Fig. 5.26 y Fig. 5.27, que son alquilfenoles etoxilados ramificados clase II y III respectivamente.

Tabla 5.25. Identificación de la peligrosidad de compuestos orgánicos detectados en fuentes de abastecimiento subterráneas influidas por el uso agrícola de agua residual cruda o parcialmente tratada

NO. CAS	COMPUESTO ORGÁNICO	NO. DE MUESTRAS POSITIVAS	SE ENCUENTRA CAS EN TOXTREE	SE ESTIMÓ PELIGROSIDAD EN TOX TREE
67-66-3	Cloroformo	9	Sí	III
71-43-2	Benceno	8	Sí	III
75-29-6	2-Cloropropano	1	Sí	III
75-83-2	2,2-Dimetilbutano	1	Sí	I
75-25-2	Tribromometano (bromoformo)	1	Sí	III
78-59-1	Isoforona		Sí	II
78-87-5	1,2-Dicloropropano	15	Sí	III
78-99-9	1,1-Dicloropropano	1	Sí	III
79-00-5	1,1,2-Tricloroetano	18	Sí	III
79-34-5	1,1,2,2-Tetracloroetano	4	Sí	III
95-47-6	1,2-Dimetilbenceno	1	Sí	III
103-65-1	n-Propilbenceno	1	Sí	I
106-46-7	1,4-diclorobenceno	2	Sí	III
106-42-3	p-Xileno	4	Sí	I
107-06-2	1,2-Dicloroetano	19	Sí	III
108-24-7	Ahídrido de ácido acético	4	Sí	III
108-88-3	Tolueno	13	Sí	III
108-67-8	1,3,5-Trimetilbenceno	1	Sí	I
108-38-3	1,3-Dimetilbenceno	2	Sí	I
109-99-9	Tetrahidrofurano	3	Sí	III
100-41-4	Etilbenceno	4	Sí	I

NO. CAS	COMPUESTO ORGÁNICO	NO. DE MUESTRAS POSITIVAS	SE ENCUENTRA CAS EN TOXTREE	SE ESTIMÓ PELIGROSIDAD EN TOX TREE
110-56-5	1,4-Diclorobutano	14	Sí	III
110-12-3	5-Metil-2-hexanona	1	Sí	II
124-40-3	Dimetilamina	11	Sí	III
127-18-4	Tetracloroetileno	1	Sí	III
496-11-7	Indano	1	Sí	III
507-09-5	Ácido tioacético o etanotioico	1	Sí	III
507-45-9	2,3-Dicloro-2-metilbutano	1	NO	III
513-37-1	1-Cloro-2-metil-1-propeno	19	Sí	III
526-73-8	1,2,3-Trimetilbenceno	1	Sí	I
591-97-9	1-Cloro-2-buteno	2	Sí	III
594-37-6	1,2-Dicloro-2-metilpropano	19	Sí	III
594-72-9	1,1-Dicloro-1-nitroetano	6	Sí	III
594-20-7	2,2-Dicloropropano	1	Sí	III
563-47-3	3-Cloro-2-metil-1-propeno	3	Sí	III
565-61-7	3_metil_2_pentanona	1	Sí	I
591-87-7	2-Propeniléster del ácido acético	4	Sí	II
594-36-5	2-Cloro-2-metilbutano	1	Sí	III
616-19-3	1,3-Dicloro-2-metilpropano	3	Sí	III
616-21-7	1,2-Diclorobutano	17	Sí	III
620-14-4	1-Etil-3-metilbenceno	1	Sí	I
624-96-4	1,3-Dicloro-3-metilbutano	1	Sí	III
631-65-2	2-Cloro-3-metilbutano	2	Sí	III
683-53-4	2-Bromo-1,1-dicloroetano	3	Sí	III
921-03-9	1,1,3-Tricloro-2-propanona	2	Sí	III
926-57-8	1,3-Dicloro-2-buteno	4	Sí	III
1003-14-1	Propiloxirano <i>1,2-epoxipentano</i>	1	Sí	III
1067-09-0	2-Clorometil-1,3-dicloro-2-metilpropano	17	Sí	III
1190-22-3	1,3-Diclorobutano	9	Sí	III
1192-31-0	2-Metil-3-(1-metiletil)-oxirano	1	Sí	III
1622-32-8	2-Cloroetanosulfonilcloruro	1	Sí	III
1871-57-4	3-Cloro-2-(clorometil)-1-propeno	3	Sí	III
1871-58-5	1,2,3-Tricloro-2-metilpropano	16	Sí	III
2916-68-9	2-(Trimetilsilil)-etanol	2	Sí	III
3017-95-6	2-Bromo-1-cloropropano	2	Sí	III
3405-32-1	1,2,3,4-Tetraclorobutano	10	Sí	III
3518-65-8	Clorometanosulfonilcloruro	2	Sí	III
3922-27-8	1,1,1-Tris(clorometil)etano o cloropentano	1	NO	III

NO. CAS	COMPUESTO ORGÁNICO	NO. DE MUESTRAS POSITIVAS	SE ENCUENTRA CAS EN TOXTREE	SE ESTIMÓ PELIGROSIDAD EN TOX TREE
4360-57-0	2-Pentadecil-1,3-dioxolano	1	NO	III
4461-41-0	2-Cloro-2-buteno	6	SÍ	III
4749-27-3	3,3,3-Tricloro-2-metil-1-propeno	4	NO	III
5150-80-1	1,6-Heptadien-3-ino	1	NO	III
7581-97-7	2,3-diclorobutano	3	SÍ	III
21020-24-6	3-Cloro-1-butino	1	SÍ	III
26073-26-7	Cloruro de 2,2-dicloropropanoilo	1	SÍ	III
27126-22-3	4-Azidoheptano	1	SÍ	III
29921-38-8	4-Etil-1,3-diosolano	1	NO	III
31124-40-0	Butilisopropilsulfona	1	NO	III
31702-33-7	1,1,3-Tricloro-2-metil-1-propeno	5	NO	III
38585-79-4	1-Bromo-2,3-diclorobutano	10	NO	III
42781-12-4	1-(1-metiletoxi)-2-propano	1	NO	III
41898-89-9	2,4-Dimetil-2,3-heptadien-5-ino	1	NO	III
52097-85-5	Propenilidenciclobuteno	1	NO	II
54833-05-5	1,1,3,3-Tetracloro-2-metilpropano	9	NO	III
54410-84-3	1-Bromo-2-cloro-2Buteno	1	NO	III
107323-92-2	Cloro-(3,4,4-trimetil1,2-dioxetan-3-il) metiléster del ácido fórmico	5		
	1,3-Dicloro-2-metilpropeno	16	NO	III
	Propiléster del ácido tricloroacético	1	NO	III
	Propil éster del ácido cloroacético	2	NO	III
	2-Clorbencil-2,2,2-tricloro-1-(p-toluidino)etilcarbamato	2		
	dl-Homoserinlactona	1	NO	III

Tabla 5.26. Compuestos fenólicos cuya peligrosidad se identificó mediante No. CAS o editando la estructura en el programa

No. CAS	COMPUESTO ORGÁNICO	SE ENCUENTRA CAS EN TOXTREE	SE ESTIMÓ PELIGROSIDAD EN TOXTREE
80-05-7	Bisfenol a	SÍ	III
104-35-8	4-nonilfenol-monoetoxilado	NO	III
949-13-3	2-octilfenol	SÍ	II
1806-26-4	4-octilfenol	SÍ	II
1322-97-0	4-octilfenol monoetoxilado	SÍ	III
2315-61-9	p-etilfenol-dietoxilado	NO	III

No. CAS	COMPUESTO ORGÁNICO	SE ENCUENTRA CAS EN TOXTREE	SE ESTIMÓ PELIGROSIDAD EN TOXTREE
2315-62-0	p-octilfenol-dietoxilado	NO	III
2315-64-2	p-octilfenol-dietoxilado (octoxinol-5)	NO	III
2315-67-5	4-tert-octilfenol-etoxilado	NO	II
9014-92-0	Docecilfenol etoxilado	Sí	III
9016-45-9	Nonilfenol monoetoxilado	Sí	II
9063-89-2	Octilfenoles etoxilados	Sí	II
25154-52-3	Nonilfenol	Sí	II
26027-38-3	Nonilfenol etoxilados	Sí	I
27176-93-8	Nonilfenol dietoxilado	Sí	II
68412-54-4	Alquilfenoles etoxilados ramificados	Sí	III
68987-90-6	Alquilfenoles etoxilados ramificados	Sí	II
84852-15-3	Nonilfenol etoxilado	NO	III

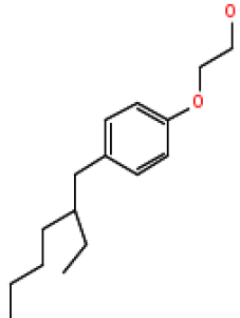
Structure	Properties
	<p>SMILES = toxTree.tree.cramer.CramerTreeResult = 1N,2N,3N,5N,6N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30Y, 31N,32Y cdk:Comment = Retrieved from http://apps.ideaconsult.net:8080/ambit2/query/compound/search/all?search=68987-90-6&max=1&media=chemical%2Fx-mdl-sdf</p> <p>http://www.opentox.org/api/1.1#REACHRegistrationDate = 31.05.2018 http://www.opentox.org/api/1.1#CASRN = 68987-90-6 toxTree.tree.cramer.CramerRules = Intermediate (Class II) http://www.opentox.org/api/1.1#EINECS = 614-869-4 http://www.opentox.org/api/1.1#ChemicalName = Poly(oxy-1,2-ethanediyl), 1±-(octylphenyl)-i%-hydroxy-, branched Poly(oxy-1,2-ethanediyl), a-(octylphenyl)-w-hydroxy-, branched http://www.opentox.org/api/1.1#InChI_std = InChI=1S/C16H26O2/c1-3-5-6-14(4-2)13-15-7-9-16(10-8-15)18-12-11-17/h7-10,14,17H,3-6,11-13H2,1-2H3/t14-/m1/s1 CasRN = 68987-90-6 http://www.opentox.org/api/1.1#InChIKey_std = PRAQADPDFMLFFB-CQSZACIVSA-N</p>

Fig. 5.26. Identificación de la peligrosidad de un alquilfenol etoxilado ramificado a través de ToxTree, en este caso las reglas de Cramer indican que el compuesto es un tóxico Clase II

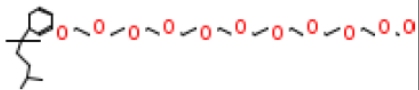
Structure	Properties
	<p>SMILES = <chem>OCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOCOC1c</chem> <chem>ccc(c1)C(C)(C)CCC(C)C</chem> toxTree.tree.cramer.CramerTreeResult = 1N,2N,3N,5N,6N,7N,16N,17N,19N,23Y,27Y,28N,30Y, 31N,32N,22N,33N toxTree.tree.cramer.CramerRules = High (Class III)</p>

Fig. 5.27. Identificación de la peligrosidad de un alquilfenol etoxidado ramificado a través de ToxTree, en este caso las reglas de Cramer indican que el compuesto es un tóxico Clase III

El interés particular sobre compuestos como los etoxilatos de nonilfenol, alquilfenoletoxilados ramificados y otros nonilfenoles que no han sido evaluados se debió a dos factores: a) fueron detectados en varias fuentes de abastecimiento en la zona de estudio, localizada en un distrito de riego con aguas residuales y, b) aunque estos compuestos son biodegradables, la estructura y alertas estructurales de algunos de éstos, indican que son tóxico clase III. Cabe señalar que los nonilfenoles y productos de ruptura o degradación tienen potencial para alterar al sistema endocrino, esto es pueden actuar como mimetizadores en y unirse a sitios receptores en hormonas tales como estrógenos, por ejemplo.

El uso de estas herramientas para analizar los datos de calidad del agua y tamizaje de compuestos orgánicos presentes en el acuífero, mostraron la facilidad en su uso, y soportaron junto con otros criterios de calificación, la priorización de contaminantes para la zona de estudio, a fin de implementar al menos un estudio de calidad del agua más detallado y específico. Asimismo, pusieron de manifiesto algunas necesidades:

- a) Monitoreo detallado de compuestos orgánicos emergentes en zonas en donde el acuífero es afectado por infiltraciones de aguas residuales crudas o parcialmente tratadas
- b) Estudio de caracterización de la exposición a contaminantes químicos emergentes en habitantes de distritos de riego con aguas residuales, como soporte a un estudio de evaluación de riesgos a la salud pública
- c) Revisar el actual esquema normativo de reúso y reciclamiento del agua en México

5.8 CONCLUSIONES

Las herramientas *in silico* o de no ensayo tienen un alto potencial en toxicología; debido a que llevan a cabo combinando diferentes aproximaciones y enfoques, son más objetivas que las pruebas *in vivo* o *in vitro* y permiten el manejo de una gran cantidad de información.

El análisis de Free – Wilson es fácil de hacer, ya que hay separación clara entre los efectos de distintos sustituyentes, necesita al menos dos sitios de variación de sustituyentes. Las principales limitaciones se deben a que puede requerir muchas variables y no es extrapolable, sólo puede haber interpolación.

El análisis de Hansch correlaciona actividades con propiedades fisicoquímicas, admite cierto grado de extrapolación, pero sólo es aplicable a series de congéneres; funciona mejor con variación de sustituyentes en compuestos aromáticos. Las limitación son básicamente que no tiene en cuenta estructura 3D, hay riesgo de correlaciones por azar y riesgo de error si se extrapola a estructuras muy alejadas del conjunto inicial.

3D-QSAR (CoMFA y CoMSIA), tienen como ventajas que consideran estructura 3D aplicables a conjuntos de estructuras disímiles; asimismo consideran que los campos estéricos, electrostáticos, hidrofóbicos y de puentes de H generan mapas de interacciones favorables y desfavorables. Las limitaciones básicas consisten en la incertidumbre sobre la conformación activa, incertidumbre sobre los modos de unión de diferentes ligandos, alto riesgo de correlaciones por azar y sólo son aplicables a datos de actividad *in vitro*, razón por la que no se hizo un análisis detallado de estas metodologías en el presente estudio.

Evidentemente, por factores éticos y económicos hay una tendencia, al menos en los países miembro de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón, para modificar los actuales paradigmas de evaluación de riesgos a la salud humana y ambiental, basados en pruebas *in vivo*, con modelos animales mamíferos y promover las pruebas *in silico* o de no ensayo como una herramienta de tamizaje y de priorización de compuestos.

El uso de las pruebas *in silico* para fines regulatorios, está evolucionando rápidamente, pero aún se requiere más investigación, desarrollo y aplicaciones para su uso como herramienta de juicio y valor regulatorios.

En el caso de los modelos cuantitativos relaciones estructura-actividad, dirigidos a la evaluación de riesgos a la salud pública, es particularmente importante establecer los alcance y capacidad predictiva de los mismos, lo que lleva a la necesidad de la validación adecuada por parte de

entidades u organizaciones ajenas a los desarrolladores de modelos y usuarios finales, esto evita en gran medida el conflicto de intereses.

La aplicación exploratoria de ToxTree y OpenTox, para identificar la peligrosidad de moléculas como los etoxilatos de nonilfenol ramificados, mostraron la facilidad en el uso de estas herramientas, y soportaron la priorización de contaminantes para un acuífero afectado por aguas residuales a fin de implementar al menos un estudio de calidad del agua más detallado y específico.

6 BIBLIOGRAFÍA

Abellan M N, Bayarri B, Gimenez J, Costa J. 2007. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂ Applied Catalysis B. Environmental. **74**(3-4): 233-241

Andresen, M., and Krewski, D. Toxicity testing in health 21st century: bringing the vision to life. Forum series, part I. Toxicological Sciences. **107**(2): 324-330

Antonopoulou M, Konstantinou I. 2011. 7th International Symposium MGPR "Paolo Cabras", Thessaloniki, Greece, 9-11 November

Augugliaro, V., García-López, E., Loddo, V., Malato-Rodríguez, S., Maldonado, I., Marci, G., Molinari, R., Palmisano, L., 2005. Degradation of lincomycin in aqueous medium: Coupling Of Solar Photocatalysis And Membrane Separation. Sol. Energy **79**: 402-408.

Bahnemann D.W. 1999. Photocatalytic detoxification of polluted water, in the handbook of environmental chemistry, Boule P., *Editor Berlin/Heidelberg: Springer*

Benefati, E. 2010. The Caesar Project for *in silico* models for the REACH legislation. Chemistry Central. **4**(Suppl 1): 11

Birnbaum, L. 2010. Applying research to public health questions: biologically relevant exposures. Environmental Health Perspectives. **118**(4): A152

Blaauboer, B., Barratt, M., and Houston, B. 1999. The integrated use of alternative methods in toxicological risk evaluation. CVAM integrated testing strategies task force report I. ATLA. **27**: 229-247

Blake D M, Webb J., Turchi C y Magrini K. 1991. Kinetic and mechanistic overview of TiO₂-photocatalyzed oxidation reactions in aqueous solution. Solar Energy Materials. **24**: 584-593

Carballa M. 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. Water Research. **41**: 2139-2150

Cassano, A., Manganano, A., Martin, T., Young, T., *et al.* 2010. The CAESAR models for developmental toxicity. Chemistry Central Journa. **4**(Suppl 1): 54

CDC. Center for Disease Control and Prevention. 2005. Third national report on human exposure to environmental chemicals. US Department of Health and Human Services. Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/exposurereport/3rd/pdf/thirdreport.pdf>

Chacón, C. J. M. 2003. Estudios de fotocatalisis para el tratamiento de agua residual de la industria textil. Tesis de maestría (Ingeniería Ambiental). Facultad de Ingeniería, UNAM. México D.F. México. 149 pp

Chapin, R., and Stendman, D. 2009. Endless possibilities: stem cells and the vision for toxicology testing in the 21st century. *Toxicol Sci.* **112**: 17-22

Chuang L. C., Luo C. H. , Huang S. W., Wu Y. C., Huang Y. C. 2011. Photocatalytic Degradation Mechanism and kinetics of caffeine in aqueous suspension of Nano-TiO₂. *Advanced Materials Research (Volume 214)*

Cohen, E. 2009. Biologically relevant exposure science for 21st century toxicity testing. Forum Series-Part IV. *Toxicological Sciences.* **111**(2): 226-232

Collares, P. M. 2005. Energía solar óptica sin imágenes para la producción de agua limpia. En: *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua.* M. Blesa y J. Blanco, eds. Plataforma Solar de Almería y unidad de Actividad Química, CAC, CNEA, Argentina. 113 pp.

Coutiño, E., Purata, A., y Hernández P. 2010. Citocromo P450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico-carcinogénico. *Revista de Educación Bioquímica.* **29**(2): 39-52

Cronin, M., Jaworska, J., Walker, J., *et al.* 2003a. Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict health effects of chemical substances. *Environ Health Perspect* **111**:1 391–1401 (2003). doi:10.1289/ehp.5760 available via <http://dx.doi.org/> [Online 6 February 2002]

Cronin, M., Walker, J., Jarowska, J., *et al.* 2003b. Use of QSARs in international decision-making frameworks to predict ecologic effects and environmental fate of chemical substances. *Environ Health Perspect* **111**:1376–1390 (2003). doi:10.1289/ehp.5759 available via <http://dx.doi.org/> [Online 6 February 2003]

Cronin, M. 2009b. Prediction of Harmful Human Health Effects of Chemicals from Structure. In: *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and applications.* Ed. Thomas Puzyn, Jerzy Leszczynski and Mark T. D. Cronin. Springer. USA. 420 pp

Cronin, M. 2009b. Quantitative structure-activity relationships (QSARs)- applications and methodology. In: *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and applications*. Ed. Thomas Puzyn, Jerzy Leszczynski and Mark T. D. Cronin. Springer. USA. 420 pp

Dalmázio I , Santos L. S , Lopes R. P., Eberlin M. N., Augusti R. I. 2005. Advanced oxidation of caffeine in water: on-Line and real-time monitoring by electrospray ionization mass spectrometry Environ. Sci. Technol. **39**: 5982-5988

Dix, D., Houck, K., Martin, T., *et al.* 2007. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. Toxicological Sciences. **95**(1): 5-12

Doll, T.E. and Frimmel, F.H. 2004. Kinetic study of photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibrac acid, iomeprol and iopromide assisted by different TiO₂ materials determination of intermediates and reactions pathways. Water Research. **38**: 955-964

Domènech X., Jardim W. F. y Litter M.I. 2001. Cap.1 Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. En: *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*. Texto colaborativo elaborado por la Red CYTED VIII-G. Usos de óxidos semiconductores y materiales relacionados para aplicaciones ambientales y ópticas. Editado por Miguel A. Blesa

DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea. 2003. Pregunta escrita E-0316/03 de Chris Davis (ELDR) a la comisión. 10 de febrero de 2003, pp1

Dudek, A., Arodz, T., and Gálvez, J. 2006. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. Combinatorial chemistry & High Throughput Screening. **9**: 213-228

Even-Ezra, I., Mizrahi, A., Gerrity, D., Snyder, S., Salveson, A., Lahav, O. 2009. Application of a novel plasma-based advanced oxidation process for efficient and cost-effective destruction of refractory organics in tertiary effluents and contaminated groundwater. Desalination and water treatment. **11**: 236-244

Fenz, R., Blaschke, A.P., Clara, M., Kroiss, H., Mascher, D., y Zessner, M.(2005) Quantification of sewer exfiltration using the anti-epileptic drug carbamazepine as marker species for wastewater. Water Science and Technology. **52**(9): 209-217

Fernández, T., Diogo, M., Clark, D., *et al.* 2009. High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. Trends Biotechnol. **27**:342-349

Gee, D. 2006. Late lessons from early warnings: Toward realism and precaution with endocrine-disrupting substances. *Environ Health Perspect.* **114**(suppl 1): 152–160

Gerrity, D., Stanford, B., Trenholm, R., Snyder, S. 2009. An evaluation of a pilot-scale nonthermal plasma advanced oxidation process for trace organic compound degradation. *Water Research* doi:10.1016/j.watres.2009.09.029

Hardy, B., Douglas, N., Helma, C., Rautemberg, M., *et al.*, 2010. Collaborative development of predictive toxicology applications. *Cheminformatics.* **2**: 7. doi:10.1186/1758-2946-2-7

Hartung, T., and Hoffman, S. 2009. Food for thought ... on *In Silico* methods in Toxicology. *ALTEX.* **26**(3/09): 155-166

Heberer T., Reddersen K., and Mechlinski. 2002. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology.* **46**(3): 81-88

Hernández, A., Martínez, A., Gil, F., Rodrigo, L., y López, O. 2011. Tema 2. Relación estructura-actividad. En: Curso de Toxicología Básica o fundamental. Diapositivas 21 a la 33. <http://www.ugr.es/~ajerez/proyecto/t2-25.htm>

Hoffman M.R. 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical Reviews.* **95**(1): 69-96

Homen V., Santos L. 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices. A review. *Journal of Environmental Management.* **92**: 2304-2347

Hua W; Bennett E., and Letcher, R. 2006. Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River, Ontario, Canada. *Water Research.* **40**: 2259-2266

Ilisz I, László Z, Dombi A. 1999. Investigation of the photodecomposition of phenol in near-UV-irradiated aqueous TiO₂ suspensions. I: Effect of charge-trapping species on the degradation kinetics. *Applied Catalysis A: General.* **180**: 25-33

Judson, R., Houck, K., Kavlock, R., Knudsen, T., Martin, M., Mortensen, H., Reif, D., Rotroff, D., Shah, I., Richard, A., and Dix, D. 2010. *In vitro* screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: The ToxCast Project. *Environ Health Perspect.* **118**: 485-492

Jiménez B, Chávez A, Gibson R, Becerril J, Maya C y Hernández C. (2008). Complemento de la caracterización del agua de consumo en el Valle del Mezquital. Instituto de Ingeniería de la UNAM. Informe final. México, Proyecto 6344

Kinsner-Ovaskainen A., Akkan, Z., Casati, S., Coecke, S., *et al.* 2009. Overcoming barriers to validation of non-animal partial replacement methods/integrated testing strategies: The Report of an EPAA–ECVAM workshop. *ATLA*. **37**: 1-8

Knight, A. 2008. Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing. *Altex*. **25**(3): 213-231

Kotcharaksa K. 2008 The Mechanisms, products, and Kinetic of Carbamazepine-Free chlorine reactions. Thesis submitted of the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial Fulfillment of the requirements for the degree of master of Science. Blacksburg, Virginia pp. 1-43

Leclercq M., Mathieu O., Gomez E., Casellas C., Fenet H., and Hillarie D. 2009. Presence and fate of carbamazepina, oxcarbazepina and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch. Environment Contaminants Toxicology*. **56**: 408- 415

Liebsch, M., Grune, B., Seiler, A., *et al.* 2011, Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol*. **85**: 841-858

Lioy, P., and Rapaport, S. 2011. Exposure science and the exposome: an opportunity for coherence in the environmental health sciences. *Environmental Health perspectives*. **118**(11): A466-A467

McDowell D. 2005. Ozonation of carbamazepine in drinking water: Identification and kinetic study of major oxidation products. *Environmental Science Technology*. **39**: 8014-8022

Nachman, K., Fox, M., Sheenan, M., Burke, T., Rodricks, J., and Woodruff, T. 2011. Leveraging epidemiology to improve risk assessment. *The Open Epidemiology Journal*. **4**: 3-29

NICNAS. 2011. New NICNAS legislation. *NICNAS Matters*. **32**:4

NTP, NCGC, EPA, and FDA MOU, http://epa.gov/ncct/download_files/tox21/MOU_EPA-NTP-NCGC-FDA-Without-Signature-Page.pdf

NRC. 2007. *Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy*. Comitee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, National Research Council. National Academies/Advisers to the Nation on Science, Engineering, and Medicine. USA. 196 pp

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2011. 40 Years of Chemicas safety at the OECD: quality and efficiency. 48 pp

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2009. OECD strategic approach in pesticide risk reduction. ENV/JM/MONO(2009)38. No claified. 18 pp

OECD. 2002. Manual for investigation of HPV chemicals.

Ötker, H.M., Akmehmet-Balcio_glu, I., 2005. Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. J. Hazard. Mater. **122**: 251-258

Parmon, V. N. 1997. Photocatalysis as a phenomenon: Aspects of terminology. Catalysis today. **137**:144

Parrott, J., Wade, M., Timm, G., and Brown, S. 2001. An overview of testing procedures and approaches for Identifying endocrine disrupting substances. Water Qual. Res. J. Canada. **36**(2): 273-291

Pastor, M. Álvarez, J. s/f. Técnicas QSAR en diseño de fármacos. Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá, España. Pp 69-78

Pérez P.J.M., y Sevilla P.A. 2009. Técnica de ELISA. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Laboratorio de Inmunología L-121. pp. 1 -3.

Prairie M.N. 1993. Investigation of TiO₂ photocatalysis for the treatment of water contaminated with metals and organic chemicals. Environmental Science Technology. **27**(9): 1776-1782

Prieto, P., Baird, A., Blaauboer, B., *et al.* 2006. The assessment of repeated dose toxicity *in vitro*: a proposed approach. ATLA. **34**: 315-341

Raunio, H. 2011. *In silico* toxicology-non-testing methods. Frontiers in Pharmacology. **2**: Art. 33.

Rhomberg, L. 2009. In: News Focus. Tox21: new dimensions of toxicity testing. Environmental Health Perspectives. 117(8): 349-353

Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J., Prados-Joya, G., Ferro-García, M.A., Bautista-Toledo, I., 2008. Removal of pharmaceutical compounds, nitroimidazoles, from waters by using the ozone/carbon systems. *Water Res.* **42**: 4163- 4171.

Savage, N. and Diallo, M. S. 2005. Nanomaterials and water purification: Poportunities and challenges. *Jorunal of Nanoparticles Research.* **7**: 331-342

Schmith, Ch. 2009. Tox21: new dimensions of toxicity testing. *Environmental Health Perspectives.* **117**(8): 349-353

Schoonen, W., Westering, W., and Horbach, G. 2009. High-throughput screening for analysis of in vitro toxicity. *EXS.* **99**; 401-452

Selassie, C. 2003. Chapter 1. History of quantitative structure-activity relationships. In: *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. Sixth Ed. Vol. 1: Drug discovery. Ed. Donald, J. Abraham. Johun Wiley andSons, Inc. pp:1-47

Serpone, N., and Khairutdinov, R. 1996. En: *Semiconductor Nanoclusters. Studies in Surface Science and Catalysis*, Vol. 103. Kamat P V y Meisel D (Eds). Elsevier Sci. B. V.

Simon-Hettich, b., Rothfuss, A., Steger-Hartmann, T. 2006. Use of computer-assisted prediction of toxic effects of chemical substances. *Toxicology.* **224**: 156-162

Sirés, I., Brillas, E. 2011. *Environment International*. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.07.012>,

Sonntag V. (2008) Advanced oxidation processes: mechanistic aspects. *Water Science and Technology.* **49**(3): 1015-1021

Spielmann, H. 2005. Progress in establishing *in vitro* alternatives to animal experimentats-Ethical and scientific challenges. *Review. ALTEX.* **11**(2): 89-100

Stamatelatou, K. 2003. Pharmaceuticals and health care products in wastewater effluents; The example of carbamazepine. *Water Science and Technology.* **3**(4):131-137

Steven, M. 2009. Toxicology: Testing in the third dimension. *Nat. Nanotechnol.* **4**: 342-343

Theron, J., Walker, J.A., Cloete, T. 2007. Nanotechnology and water treatment: applications and emerging opportunities. *Critical Reviews in Microbiology.* **34**: 43-69

Tichý, M. 2005. Experimental Toxicology *in silico*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. **149**(2): 217–219

Tong, W., Welsh, W., Shi, L., Fang, H., and Perkins, R. 2003. Structure-activity relationship approaches and applications. Environmental Toxicology and Chemistry. **22**(8): 8pp

Van Vliet, E. 2011. Current standing and future prospects for technologies proposed to transform toxicity testing in the 21st century. ALTEX **28**(1): 17-44

Villaverdú, J. 2005. La evolución de la toxicología: de los venenos a la evaluación de riesgos. Rev. Toxicol. **22**: 153-161

Vindarell, Ma. 2007. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. Acta Bioethica. **13**(1): 41-52

Weis, B., Balshaw, D., Barr, J., Brown, D., Ellisman, M., *et al.* 2005. Personalized exposure assessment: promising approaches for human environmental health research. Environ Health Perspect **113**: 840–848. <http://dx.doi.org/>

Wild, C. 2005. Complementing the genome with an “Exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **14**:1847-1850

Willet, C., Bishop, P., and Sullivan, K. 2011. Application of an integrated testing strategy to the U. S. EPA endocrine disruptor screening program. Toxicological Sciences. **123**(1): 15-25

Wintgens, T., Salehi, F., Hochstrat, R., y Melin T. 2008. Emerging contaminants and treatment options in water recycling for indirect potable use. Water Science and Technology. **57**(1): 99-107

Xekoukoulotakis N. P, Xinidis N., Chroni M., Mantzavinos D., Venieri D., Hapeshi E., Fatta-Kassinou D. 2010. UV-A/TiO₂ photocatalytic decomposition of erythromycin in water: Factors affecting mineralization and antibiotic activity. Catalysis Today. **151**: 29–33

Zhang, G., Ji, S., Xi, B., 2006. Feasibility study of treatment of amoxicillin wastewater with a combination of extraction, Fenton oxidation and reverse osmosis. Desalination. **196**: 32-42