

DOI: <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2022.7.03>

Cómo citar:

González-Pérez, Y., González-Díaz, Y., Rodríguez Leblanch, E., Marín-Sánchez, D., Prades Escobar, E., Cedeño Soularit, N., & Castillo-Garit, J.A. (2022). Predicción Ambiental de agentes químicos combinando herramientas computacionales y biomodelos ecotoxicológicos. *Orange Journal*, 4(7), 33-44. <https://doi.org/10.46502/issn.2710-995X/2022.7.03>

Predicción Ambiental de agentes químicos combinando herramientas computacionales y biomodelos ecotoxicológicos

Environmental prediction of chemical agents combining computational tools and ecotoxicological biomodels

Recibido: 5 de marzo de 2022

Aceptado: 10 de mayo de 2022

Escrito por:

González-Pérez Yuleidis⁸

<https://orcid.org/0000-0003-1654-6019>

González-Díaz Judith⁹

<https://orcid.org/0000-0003-1240-1146>

Rodríguez Leblanch Elizabeth¹⁰

<https://orcid.org/0000-0001-9220-995X>

Marín-Sánchez Dayana¹¹

<https://orcid.org/0000-0002-7017-3287>

Prades Escobar Eliecer¹²

<https://orcid.org/0000-0002-9961-6635>

Cedeño Soularit Narvis¹³

<https://orcid.org/0000-0002-8498-8006>

Castillo-Garit Juan Alberto¹⁴

<https://orcid.org/0000-0003-0896-9484>

Resumen

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo el aumento de la utilización de agentes químicos que afectan tanto la salud humana como la ambiental. Este trabajo tiene como objetivo predecir el potencial ambiental de agentes químicos combinando herramientas computacionales y biomodelos ecotoxicológicos. Para ello, se evaluaron seis agentes químicos aplicando modelos matemáticos basados en las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), y con el Ensayo de Toxicidad Aguda con larvas de *Artemia sp* (fenol, p-nitroanilina, cloroformo, metanol, etanol, y acetona) del laboratorio de Química Analítica del Centro de Toxicología de Santiago de Cuba como ensayo de prueba, siguiendo metodologías estandarizadas a nivel internacional. Se probaron diferentes concentraciones de los agentes químicos según lo reportado en la literatura. Se midió la mortalidad de las larvas luego de 24 horas de exposición única de las concentraciones probadas, con un grupo control negativo y tres réplicas en cada experimento. Para la

⁸ Máster en Seguridad Tecnológica y Ambiental en Procesos Químicos. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Investigador Auxiliar, Santiago de Cuba. Cuba.

⁹ Doctor en Ciencias Técnicas. Facultad de Ingeniería Química y Agronomía, Universidad de Oriente, Profesor Titular, Santiago de Cuba, Cuba.

¹⁰ Licenciada en Ciencias Biológicas. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Investigador Agregado, Santiago de Cuba. Cuba.

¹¹ Máster en Ingeniería en Procesos Químicos. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Investigador Auxiliar, Santiago de Cuba. Cuba.

¹² Licenciado en Química. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Investigador Agregado, Santiago de Cuba. Cuba.

¹³ Máster en Medios Diagnósticos. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Profesor Instructor, Santiago de Cuba. Cuba.

¹⁴ Doctor en Ciencias Farmacéuticas, especialidad en Química Farmacéutica. Unidad de Toxicología Experimental, Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruiz de Zarate Ruiz", Profesor Titular, Villa Clara. Cuba.



predicción matemática en la obtención y validación del modelo se utilizaron los softwares DRAGON y QSARINS. Se determinaron las Concentraciones Letales Medias (CL50) predictivas y experimentales. Los valores de concentraciones letales medias determinadas más tóxicas resultaron $CL_{50} = 47,05$ mg/L (fenol), y $CL_{50} = 59,01$ mg/L (p-nitroanilina). En lo relacionado con la predicción, se obtuvieron para el etanol 3,880 y el cloroformo 2,575 en comparación con las esperadas de 4,107 y 2,855 respectivamente, resultando las mejores predichas. Se concluye que los compuestos producen letalidad en el biomodelo empleado, siendo los más tóxicos el fenol y la p-nitroanilina bajo las condiciones controladas de laboratorio, evidenciándose correspondencia con el modelo predictivo obtenido para este bioindicador.

Palabras Claves: ecotoxicología, QSAR, Artemia sp., bioensayos, agentes químicos.

Abstract

The growing industrial and urban development has brought with it the increased use of chemical agents that affect both human and environmental health. This work aims to predict the environmental potential of chemical agents by combining computational tools and ecotoxicological biomodels. For this, six chemical agents were evaluated applying mathematical models based on quantitative structure-activity relationships (QSAR), and with the Acute Toxicity Test with larvae of Artemia sp (phenol, p-nitroaniline, chloroform, methanol, ethanol, and acetone) of the Laboratory of Analytical Chemistry of the Toxicology Center of Santiago de Cuba as a trial test, following internationally standardized methodologies. Different concentrations of chemical agents were tested as reported in the literature. Larval mortality was measured after 24 hours of single exposure to the tested concentrations, with a negative control group and three replicates in each experiment. For the mathematical prediction in obtaining and validating the model, the DRAGON and QSARINS software were used. Predictive and experimental Median Lethal Concentrations (LC50) were determined. The values of the most toxic median lethal concentrations were $LC_{50} = 47.05$ mg/L (phenol), and $LC_{50} = 59.01$ mg/L (p-nitroaniline). Regarding the prediction, 3.880 and 2.575 were obtained for ethanol and chloroform compared to the expected 4.107 and 2.855 respectively, resulting in the best predictions. It is concluded that the compounds produce lethality in the biomodel used, the most toxic being phenol and p-nitroaniline under controlled laboratory conditions, showing correspondence with the predictive model obtained for this bioindicator.

Key Words: ecotoxicology, QSAR, Artemia sp., bioassays, chemical agents.

Introducción

Los compuestos químicos están presentes en cualquier parte del planeta y todos los seres vivos están formados por ellos. En la sociedad moderna es difícil concebir alguna actividad en la que no intervengan productos químicos, en los lugares de trabajo, en el hogar, así como en actividades de recreación, propiciando empleos, negocios e ingresos. Aparejado a esto se han descubierto un los efectos indeseables asociados al uso de algunas de las sustancias que presentan propiedades peligrosas, generando la contaminación de las diferentes matrices: agua, aire, suelo, sedimento, incluido la pérdida de los ecosistemas (Cortinas de Nava, 1999; Romero & Cantú, 2008).

La preocupación por la preservación del medioambiente ha sido el resultado a lo largo de la historia de la ocurrencia de fatales accidentes entre los que se relacionan: la masiva contaminación alimentaria de pescado con metilmercurio en Japón (Bahía Minamata) en 1950. En UK. Flixborough 1974, la explosión por ciclohexano en la Industria Química. El escape masivo de Isocianato de Metilo en India, Bhopal, 1984 y otros muchos accidentes (Aportela, 2006). Sin embargo, Cuba no queda exenta de estos accidentes donde recientemente el pasado 5 de octubre del 2018, ocurrió un derrame de petróleo producido en la Terminal de Supertanqueros en la zona industrial de la ciudad de Matanzas (Rizo, 2018).

En la actualidad, aún persiste la ocurrencia de estas problemáticas, y son la razón para el desarrollo de investigaciones que pretenden aumentar el control y la evaluación toxicológica de productos y desechos, así como de su interacción con el medio. La década de 1970 se asocia con el surgimiento de la Toxicología Ambiental y la Ecotoxicología, subdisciplinas de la Toxicología (Albert, 1997).



El nombre de Ecotoxicología es un híbrido entre la ecología y la toxicología, y estudia los efectos de las sustancias químicas sobre la estructura y función de los ecosistemas. En consecuencia, analiza los efectos adversos de los xenobióticos ambientales sobre los ecosistemas, considerados de forma integral, para el cual, a su vez, resulta indispensable el análisis a nivel individual y poblacional. Como ciencia se ocupa de un amplio rango de aspectos relacionados con la distribución de los contaminantes, bioacumulación, transporte, degradación, efectos biológicos y ecológicos, entre otros. Esta ciencia se ha valido de muchas otras como la química, la biología molecular, la evolución y las matemáticas (Repetto & Sanz, 1995).

Muchos son los métodos empleados en el estudio de los contaminantes en los ecosistemas y la predicción de su comportamiento como es el caso de los bioensayos o pruebas de toxicidad. Estos representan herramientas ampliamente utilizadas en la ecotoxicología, permitiendo realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos. Existen numerosos bioensayos a nivel de laboratorio y de campo, regulados a nivel internacional con el empleo de diferentes organismos representativos de los diversos ecosistemas que van desde algas, bacterias, plantas vasculares, invertebrados, peces, aves, lombrices, mamíferos entre otros. En lo que respecta a la ecotoxicología laboratorial, se enfoca fundamentalmente a establecer relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas, siendo mucho más económicos (Hernández, 2015). Los de campo requieren de mayores recursos y tiempo, en función de simular las condiciones ambientales reales o directamente en ambientes naturales utilizando especies propias del ecosistema en estudio. Otra de las alternativas para evaluar el potencial ambiental de agentes químicos son los estudios basados en relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés). El empleo de modelos matemáticos basados en estudios QSAR para predecir el potencial ambiental de compuestos químicos permite ahorrar tiempo y dinero (Repetto & Sanz, 1995).

En el occidente de nuestro país se encuentra el Centro Nacional de Toxicología (CENATOX), en el que el área de ecotoxicología asume investigaciones dirigidas a la evaluación de bioproductos fundamentalmente. El Centro de Toxicología y Biomedicina (en lo adelante TOXIMED), ubicado en Santiago de Cuba, es el Centro Toxicológico de la región oriental del país como parte de la Red Nacional de Toxicología. Esta entidad tiene como misión contribuir a la disminución de la morbi-mortalidad por intoxicaciones, así como proteger el medio ambiente del riesgo químico, mediante prestación de servicios científico-técnicos, capacitación de recursos humanos y ejecución de investigaciones Biomédicas aplicadas. Una de las líneas de trabajo del centro es la Ecotoxicología, enfocándose a dos vertientes tanto la aplicada o laboratorial, como en estudios de sitios contaminados.

En relación con los bioensayos laboratoriales, en nuestro centro, se ha trabajado en la estandarización de aquellos que emplean invertebrados y plantas. Los que han sido muy utilizados, ya que son organismos representativos desde el punto de vista ecológico que ocupan eslabones inferiores de la cadena trófica y por consiguiente, una alteración originada por la presencia de un contaminante, tendría repercusión en los organismos superiores, incluyendo al propio hombre (Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010; Rodríguez et al., 2014). En este grupo de métodos se encuentra el Ensayo de Toxicidad Aguda en *Artemia sp.* excelente para evaluar los efectos potenciales de diversos productos químicos sintéticos, naturales y muestras ambientales sobre ecosistemas marinos (Arencibia & Oscar, 2010; Pino Pérez & Jorge Lazo, 2010). En nuestro país se han realizado numerosas investigaciones utilizando este biomodelo (Arencibia et al., 2010; Pino Pérez & Jorge Lazo, 2010; Hernández Sorí, 2014; Hernández, 2015).

Durante la realización de investigaciones aplicadas a la Biomedicina, Toxicología Pre-clínica y Clínica, en este centro se efectúan ensayos químicos y de control de la calidad, que implican la utilización, manipulación de agentes químicos y a la generación de residuales con mezclas de ellos. Existen diferentes investigaciones aplicando estas herramientas ecotoxicológicas con otros compuestos y matrices; pero aún no existen suficientes reportes sobre la predicción del efecto ambiental de agentes químicos combinando los métodos computacionales y los bioensayos de laboratorio. Dada esta situación es necesario evaluar el potencial ambiental a través de bioensayos y de modelos matemáticos (Castillo, 2004), lo cual brindaría las herramientas primarias para tomar acciones preventivas y priorizar las correctivas, contribuyendo así a la Seguridad Ambiental de las empresas.



Para este estudio se realiza una ensayo de prueba piloto en el Laboratorio de Química de TOXIMED en el que se conoce por estudios realizados recientemente por Montes de Oca, 2016 y Marín, 2017, que los agentes químicos empleados presentan un alto riesgo desde el punto de vista laboral para aplicar ambos métodos (Marín, 2017; Montes De Oca, 2016). El mismo tiene como objetivo predecir el potencial ambiental de agentes químicos combinando herramientas computacionales y biomodelos ecotoxicológicos.

Marco Teórico

Agente químico: Un agente químico es todo elemento o compuesto químico, por sí solo o mezclado, tal como se presenta en estado natural o es producido, utilizado o vertido, incluido el vertido como residuo, en una actividad laboral, se haya elaborado o no de modo intencional y se haya comercializado o no (INSSST, 2022).

Ecosistema: Unidad de trabajo, estudio e investigación de la Ecología. Es un sistema complejo en el que interactúan los seres vivos entre sí y con el conjunto de factores no vivos que forman el ambiente: temperatura, sustancias químicas presentes, clima, características geológicas. En todo ecosistema habrá unos componentes bióticos (todos los organismos vivos: poblaciones, comunidades tanto de animales, plantas, hongos, bacterias, y cualquier otro ente viviente), que se agruparán en comunidades, y unos componentes abióticos (temperatura, humedad, suelo, rocas entre otros), integrados por la materia y la energía, de forma que se mantenga siempre un perfecto equilibrio dinámico en el trinomio vida-materia-energía (Repetto & Sanz, 1995).

Tóxico: Sustancia química que, dependiendo de la concentración y tiempo de exposición, produce alteraciones bioquímicas, fisiológicas, estructurales o la inhibición del organismo expuesto (Morales, 2004).

Toxicidad: Grado de efectividad que poseen las sustancias que, de acuerdo a su composición, son consideradas tóxicas. Siendo la medida que se emplea para identificar al nivel tóxico de diversos fluidos elementos, afectando un organismo en su totalidad (Morales, 2004).

Bioensayo de Toxicidad: Es la exposición controlada de organismos a sustancias puras o combinada, lixiviados, extractos acuosos, aguas residuales, industriales, municipales, agrícolas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto tóxico (NMX-AA, 1995).

Toxicidad aguda: Efecto adverso (letal o subletal) expuesto a los organismos de ensayo en pruebas durante un período de exposición (usualmente de pocos días) del material de ensayo.

Punto final: Medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (CL_{50} / CE_{50} / CI_{50}). También significa la respuesta del organismo para mostrar el efecto que se utiliza para indicar la finalización del ensayo, definido por un porcentaje de organismos y un tiempo de exposición (Morales, 2004).

Nauplius: larvas recién nacidas, se caracteriza por la ausencia de segmentos en el cuerpo y por presentar gran cantidad de reservas vitelinas, su sistema digestivo lo tienen en formación (no se alimentan del exterior). Sus reservas nutricionales, su pequeño tamaño y su forma de obtención (eclosión de quistes), lo hacen un alimento vivo insustituible en la acuicultura. El Nauplio es de color anaranjado, presenta en la base de la cabeza un ocelo central (ojo Nauplio). Este estadio mide aproximadamente entre 125 a 250 micras según la cepa (procedencia), y dura entre 6 a 10 horas a 25 grados centígrados (NMX-AA, 1995).

Quistes: Estado de desarrollo embrionario en etapa de gástrula, protegido por una cubierta constituida por tres estructuras, corion, membrana cuticular externa y cutícula embrionaria. Los quistes tienen una masa de 2,8 μg -4 μg . Miden 200 μm -300 μm y son de color marrón claro. Cuando están deshidratados tienen la apariencia de balones desinflados, mientras que si se hidratan se tornan esféricos (NMX-AA, 1995).



Metodología

La investigación prueba se realizó en el Centro de Toxicología y Biomedicina de Santiago de Cuba (TOXIMED), perteneciente a la región Oriental. En el cual se efectuó la parte experimental, específicamente en el Laboratorio de Ecotoxicología, durante los meses de Abril/2018- Abril/2019.

Tomando como base los estudios realizados por Montes de Oca, 2016 y Marín, 2017, relacionados con la evaluación de riesgo químico laboral en TOXIMED, se realizó la selección de los agentes químicos a estudiar empleados con mayor frecuencia en el Laboratorio de Química Analítica (tabla 1), para investigar su potencial ambiental.

Tabla 1.

Agentes químicos en estudio con el rango de concentraciones probadas en el ensayo ecotoxicológico realizado.

Compuestos	Marca y Grado de Pureza	Rango de soluciones a probar (mg/L)
cloroformo	EMSURE ^R	143; 286; 561; 1134; 2268; 4524
metanol	SUPRASOLV ^R . 99,8%	10893; 21787; 43574; 87148; 174297; 348595
etanol	LICHROSOLV ^R . 99,9%	11955; 23919; 47820; 95641; 191282; 382565
acetona	TITOLCHIMICA. 99,5%	522; 2100; 4065; 8386; 16796; 33477
fenol	QUEMICAL. 99%	47; 84; 178; 348; 696; 2804
p-nitroanilina	LICHROSOLV ^R . 99,5%	0,1; 1; 10; 100; 1000; 2000

La modelación matemática se realizó en el departamento de Farmacia de la facultad de Ciencias Naturales de la Universidad "Marta Abreu" de Villa Clara. Para la obtención y validación del modelo se utilizaron los softwares DRAGON y QSARINS según lo referido en la literatura para estos fines (Schultz & Cronin, 2003).

En lo referente a la Evaluación Ecotoxicológica utilizando como biomodelo las larvas de *Artemia sp.* se tomaron en cuenta las siguientes variables:

Variable independiente: Hace referencia al rango de las concentraciones a las cuales fue expuesto el biomodelo en los ensayos.

Variables dependientes: Durante la realización del bioensayo es la Concentración Letal Media (CL₅₀) después de 24 horas de exposición.

Constantes: Las variables constantes son: número de larvas, tiempo de exposición, volumen de muestra, número de concentraciones que se aplica en el bioensayo.

En este estudio se utilizaron quistes viables de *Artemia sp.* suministrados por el Centro de Desove del Camarón del municipio de Manzanillo provincia Granma.

- Género: *Artemia*
- Especie: *sp.*
- Sexo: hembras y machos
- Número de animales: 10 animales por tratamiento.
- Edad: juveniles (*Nauplius* del primer y segundo estadio de crecimiento)

El método de administración de la sustancia a probar fue por aplicación en el medio (agua de mar artificial) a diferentes concentraciones de los compuestos químicos.

Se probaron seis concentraciones en cada caso, aplicadas de manera única para todas las determinaciones, al comienzo del ensayo de toxicidad, cuyo tiempo de duración es de 24 horas. El ensayo se realizó por triplicado.

El esquema específico para el bioensayo de toxicidad (NMX-AA, & de la Federación, 1996; Vanhaecke & Persoone, 1984) se resume en la figura 1.

- Se depositaron 10 *nauplius* (Larvas de *Artemia*) en cada recipiente (placas de petri). El volumen de agua transferido con las *nauplius* no fue superior a 50 μ L.
- Se evaluaron las concentraciones mencionadas de los agentes químicos en estudio.
- Cada recipiente se completó con un volumen de 10 mL de las concentraciones respectivas del tóxico en estudio y se incubaron en oscuridad a temperatura de 25 ± 3 °C por 24 hrs.
- Culminado el período de exposición se contaron al estereoscopio las larvas supervivientes y se anotó cualquier comportamiento anormal. Los efectos sobre la mortalidad se expresaron como CL_{50} 24hrs, y se determinaron por el programa Probit de la EPA, propuesto para la determinación de este parámetro en los diferentes ensayos toxicológicos.

El grado de toxicidad se definió en función del rango en que se encontraron los valores de CL_{50} de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico ($CL_{50} < 10$ μ g/mL), muy tóxico (10 μ g/mL $< CL_{50} < 100$ μ g/mL), moderadamente tóxico (100 μ g/mL $< CL_{50} < 1000$ μ g/mL) y no tóxico ($CL_{50} > 1000$ μ g/mL) (Valdés et al., 2003).

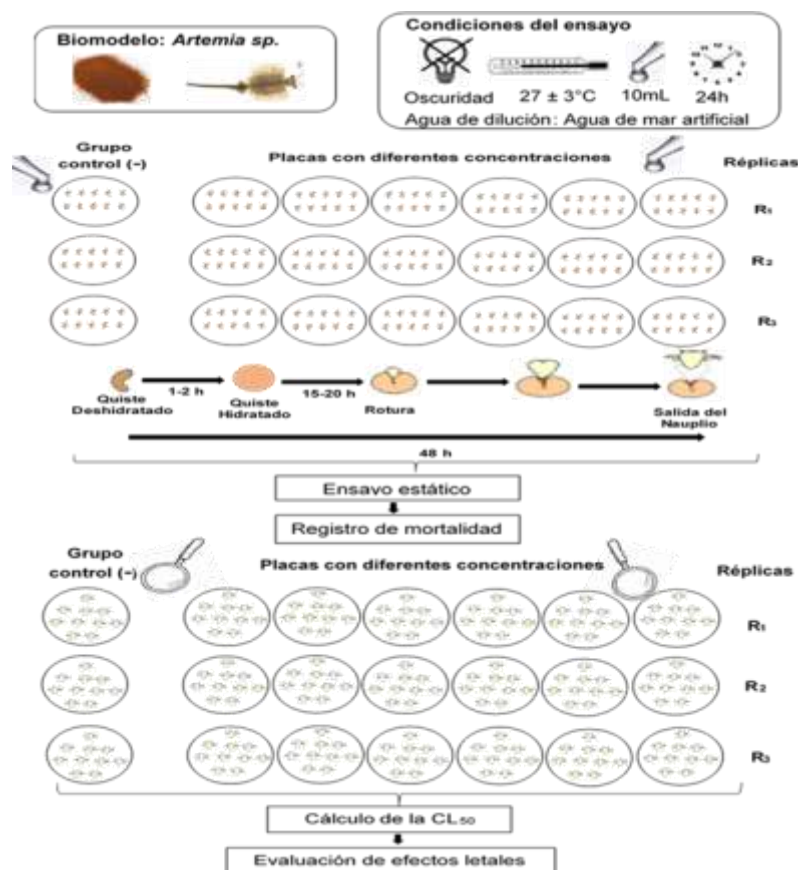


Figura 1. Esquema general del Ensayo de Toxicidad Aguda con larvas de *Artemia sp.*

Resultados

Durante el desarrollo de un modelo QSAR se obtienen varios modelos alternativos tras la selección de los descriptores por lo que son excluidos aquellos que no presentan una calidad adecuada, a fin de evitar una inútil lista de modelos como salida final. En este estudio se seleccionó el modelo que tiene: mejor ajuste al

problema, menor número de variables (principio de parsimonia) y una menor correlación entre los descriptores, así como entre ellos y la respuesta, es decir, el modelo tiene baja multicolinealidad y buena correlación con la respuesta modelada. El mejor modelo de regresión obtenido para la predicción del potencial ambiental en *Artemia sp.* se muestra a continuación junto a sus parámetros estadísticos:

Log CL₅₀ = 123,405 (±3,288) + 10,571(±2,67) ***BCUTw-11** + 5,656(±0,162) ***ATSc1** - 4,359(±0,502) ***SCH-7** + 1,222(±0,007) * **khs.ssssC** - 0,297(±0,028) ***khs.sssN** - 1,257(±0,194) ***khs.ssO** - 0,563(±0,194) ***khs.sCI** - 0,043(±0,202) ***nAtomP**

$R^2 = 0,7850$
 $K_{XX} = 0,371$
 $RSS_{tr} = 20,021$

$R^2_{adj} = 0,744$
Delta K = 0,029
 $CCC_{tr} = 0,880$

$R^2 - R^2_{adj} = 0,041$
 $RMSE_{tr} = 0,627$
 $s = 0,690$

LOF = 0,834
 $MAE_{tr} = 0,476$
F = 19,168

Donde R^2 es el coeficiente de determinación, R^2_{adj} es el coeficiente de determinación ajustado, LOF es el criterio de carencia de ajuste de Friedman, K_{XX} es la correlación global entre los descriptores, Delta K es la diferencia de la correlación entre los descriptores (K_x), $RMSE_{tr}$ es la raíz de la media del error al cuadrado sobre el cálculo del entrenamiento, MAE_{tr} es el error absoluto medio en el ajuste calculado en la serie de entrenamiento, RSS_{tr} es la suma de los residuales al cuadrado en el ajuste, s es el error estándar de estimación, CCC_{tr} es el coeficiente de correlación de concordancia en el entrenamiento y F es el valor de F de Fisher.

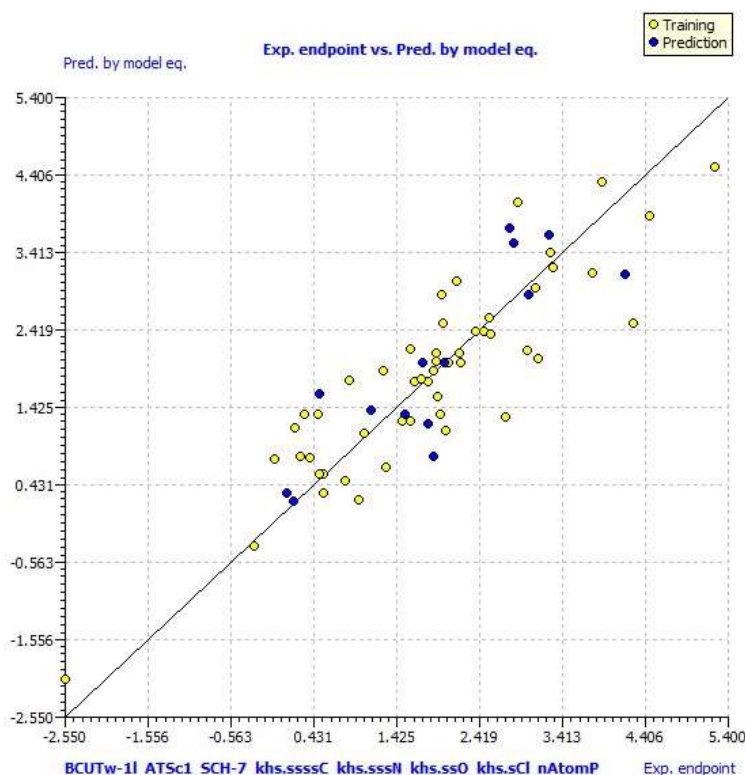


Figura 2. Valores predichos por el modelo contra valores observados.

Una vez obtenido y validado el modelo QSAR, se empleó en la predicción del potencial ambiental de los agentes químicos empleados en los ensayos del Laboratorio de Química Analítica de TOXIMED. Se calcularon los respectivos descriptores moleculares a los agentes de interés y se evaluaron con el modelo. Los resultados obtenidos de la predicción se muestran en la tabla 2 junto a los valores experimentales:

Tabla 2.

Resultados de los valores de CL_{50} predictivos para los compuestos ensayados para las larvas de *Artemia sp.*

Compuesto	Log $CL_{50}exp(ug/mL)$	Log CL_{50} predictiva
fenol	1,673	2,974
p- nitroanilina	1,771	2,720
etanol	4,107	3,880
cloroformo	2,855	2,575
acetona	3,366	2,929
metanol	4,458	3,948

Como se puede observar el modelo predice valores de CL_{50} en *Artemia sp.* cercanos a los obtenidos en los experimentos antes descritos. Los compuestos que mejor se predijeron fueron etanol, cloroformo, metanol y acetona por ese orden.

Con relación a los resultados obtenidos en el ensayo experimental, no se observó mortalidad en los grupos control, por lo que se considera válida la prueba según lo referido por Vanhaecke, 1984 (Vanhaecke & Persoone, 1984).

La figura 3 muestra los gráficos resultantes de la representación del rango de concentración probado frente al porcentaje de mortalidad de las larvas de *Artemia*, expuestas a los agentes químicos ensayados. En ella puede observarse que existe una relación directamente proporcional entre la mortalidad de las larvas y el aumento de las concentraciones de cada uno de los agentes químicos ensayados.

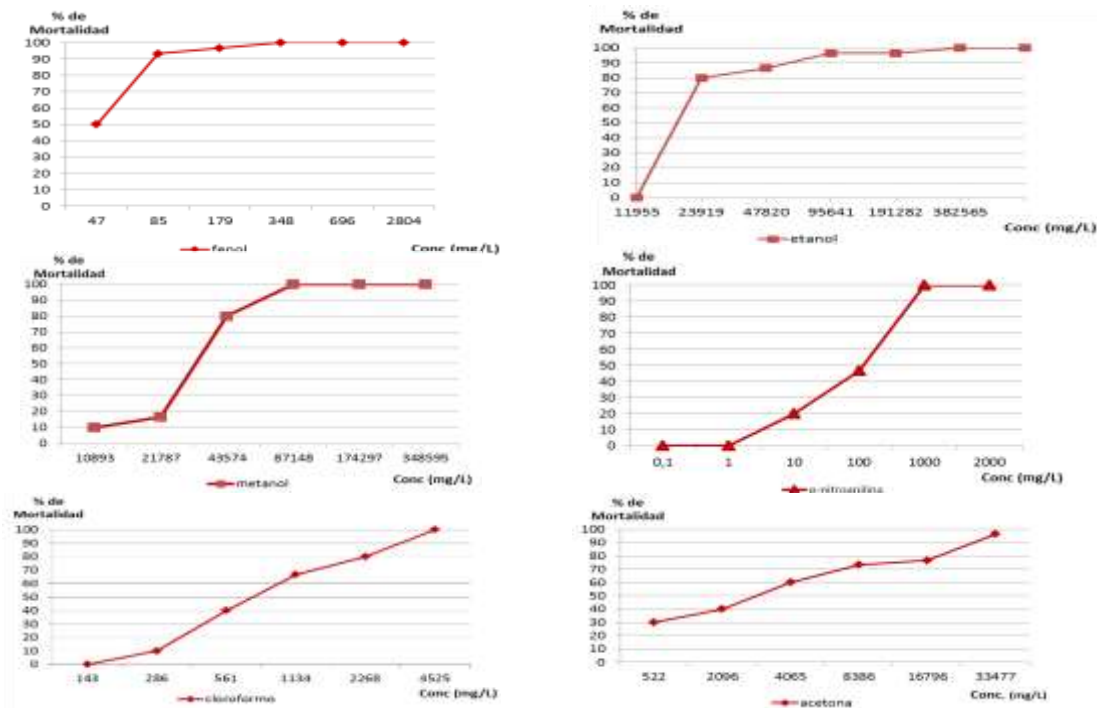


Figura 3. Mortalidad de las larvas de *Artemia sp.* por exposición a los agentes químicos en estudio.

En la tabla 3 se muestran los valores de CL_{50} de los agentes químicos evaluados en el ensayo de *Artemia sp.* y su clasificación según Valdés, 2003 (Valdés et al., 2003).

**Tabla 3.***Valores de CL₅₀ de los compuestos evaluados en el ensayo de Artemia sp.*

Compuesto	CL ₅₀ (mg/L)	Clasificación
fenol	47,05	Muy Tóxico
p-nitroanilina	59,01	Muy Tóxico
cloroformo	716,34	Moderadamente Tóxico
acetona	2323	No Tóxico
etanol	12807	No Tóxico
metanol	30758	No Tóxico

Teniendo en cuenta esta clasificación tres de los compuestos evaluados se clasifican como no tóxicos (metanol, etanol y acetona), uno como moderadamente tóxico (cloroformo) y dos como muy tóxicos (fenol y p- nitroanilina), observándose para estos últimos el máximo de mortalidad antes de culminado el tiempo de exposición del ensayo.

Discusión

El modelo presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,785 por lo que el mismo manifiesta un ajuste adecuado para modelar el potencial ambiental en *Artemia sp.*, así como un coeficiente de determinación ajustado R^2_{adj} de 0,744 que es indicativo de la conveniencia o no de añadir un nuevo descriptor al modelo de modo que, junto con un parámetro LOF bajo de 0,834 se puede decir que no existe sobre ajuste en el modelo, ya que presenta un buen ajuste con un número mínimo de descriptores. Valores similares han sido publicados recientemente en otros estudios ecotoxicológicos (Cronin, 2004; Castillo-Garit, 2008; Castillo-Garit, 2017).

Un buen ajuste del modelo es importante en un estudio QSAR, pero no es suficiente para garantizar su validez, es esencial comprobar su desempeño, es decir: el ajuste, la estabilidad en la validación interna y la capacidad para predecir nuevos productos químicos (Castillo-Garit, 2016). Además, es importante verificar que el modelo obtenido no es producto del azar. Los resultados de la validación interna dan muestra del ajuste y estabilidad del modelo. Los parámetros de la validación cruzada dejando un caso fuera (LOO *por sus siglas en inglés*) dan un criterio muy conocido: la varianza explicada en la predicción por LOO (Q^2_{LOO}). Esta técnica consiste en excluir iterativamente un compuesto del conjunto de datos, construir el modelo con los compuestos restantes y predecir el compuesto extraído. Según los resultados obtenidos se puede afirmar que las predicciones internas son buenas pues el valor de Q^2_{LOO} es 0,687 por lo que se puede considerar que el modelo es estable y robusto con un pequeño error en las predicciones (RMSEcv = 0,756 y MAEcv = 0,579). Una técnica más fuerte que se incluye en el QSARINS es la validación interna dejando varios fuera (LMO *por sus siglas en inglés*) el cual deja varios compuestos fuera y permite estudiar el comportamiento del modelo cuando se excluye un mayor número de compuestos. Los resultados del experimento de aleatorización de la variable respuesta demostraron que el modelo no es producto de una correlación casual pues los valores se alejan mucho de los valores de R^2 y Q^2 del modelo.

La validación externa, empleando una serie de predicción externa, comprueba la capacidad que tiene el mismo para predecir nuevos compuestos. Esta es la condición necesaria y suficiente para demostrar el poder predictivo de un modelo QSAR, que es en última instancia el objetivo de desarrollarlo. Los parámetros de la serie de predicción permiten decir que el modelo posee un adecuado poder predictivo (Castillo-Garit, 2017).

En cuanto a la utilización de la *Artemia* como biomodelo, es reconocida y catalogada como uno de los organismos de prueba más utilizados en ensayos de toxicidad para el monitoreo de emisiones por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA, 2002). Tiene una función clave en el flujo de energía de la cadena alimentaria en el medio marino pues es fuente de alimentación para otras especies (Manfra et al., 2015). Además, se emplea en ensayos que involucran sustancias de diferente naturaleza; como extractos de plantas; (Zubairi & Aziz, 2016) metabolitos fúngicos, complejos metálicos; (Leis et al.,





2014) mezclas de sustancias químicas y muestras ambientales (Eraso et.al, 2013), así como estudios de oligoelementos, nanopartículas entre otros, mostrando diferentes resultados que manifiestan la versatilidad de este organismo. (Libralato & Manfra, 2016; Lozano-Mercado & et al, 2017). Como parte de las numerosas aplicaciones mencionadas anteriormente está el estudio de los efectos adversos de sustancias químicas.

Los valores de CL_{50} obtenidos para cloroformo, metanol, fenol y etanol, fueron similares a los reportados por Calleja, 1994 (Calleja, Persoone, & Geladi, 1994), donde evalúan varios compuestos químicos y farmacéuticos utilizando ensayos ecotoxicológicos con invertebrados acuáticos. En relación con los valores reportados en este artículo: cloroformo (561 mg/L); metanol (43574 mg/L); fenol (178 mg/L); etanol (23910 mg/L), tres de ellos coinciden en el mismo rango de toxicidad, a excepción del fenol que resultó como **muy tóxico** en este estudio, similar a lo referido por Duan, 2018 enunciando que los valores de CL_{50} de este compuesto para crustáceos contempla esta clasificación de Altamente Tóxico. En este artículo de revisión además, se refiere que el fenol ha sido nombrado en una lista de los 20 productos químicos que probablemente representan el mayor Riesgo de estar involucrado en un SNP (sustancia peligrosa y nociva) incidente de la Organización Marítima Internacional (OMI) (Duan et al., 2018).

De igual manera, los resultados obtenidos para la acetona son similares a los referidos en las fichas de seguridad para este compuesto (Roth, 2016).

En lo referente a la p-nitroanilina, los valores de CL_{50} determinados en este estudio, representan un nuevo reporte para este bioindicador bajo las condiciones experimentales descritas.

Es válido referir que cuando analizamos valores de toxicidad, y en este caso para estimar posibles efectos ecotoxicológicos, existen diversos factores que necesariamente hay que tener en cuenta como el tiempo de exposición a la sustancia o contaminante, la biodisponibilidad en el medio en que se aplique (acuático, terrestre o aéreo), las características físico-químicas de las mismas (solubilidad, persistencia, tiempo de vida media en el ambiente, bioacumulación, biomagnificación, coeficiente de partición octanol/agua o Kow), las especies expuestas entre otros (Sparling, 2017).

Los compuestos analizados en su mayoría son solventes con una alta volatilidad en el medio, por tanto, ya este es un factor determinante en la variabilidad de las concentraciones al final del ensayo, asimismo, se refiere la baja bioconcentración y biomagnificación a través de la cadena alimentaria de estos (ver tabla 4).

Tabla 4.

Coefficiente octanol /agua de los compuestos en estudio según ficha de datos de seguridad y su posible comportamiento en el medioambiente.

Compuesto	log Kow y comportamiento en el ambiente
fenol	log Kow 1.46 poca bioacumulación.
acetona	log Kow -0.24 No se biomagnifica ni se bioconcentra en organismos acuáticos. Es biodegradable. Se disuelve en agua. Desaparece en un día por evaporación y disolución. Ligeramente peligroso para el agua.
p-nitroanilina	Muy peligroso para el agua. En la ficha de seguridad no hay reportes de datos ecológicos. No dejar que se infiltre en aguas subterráneas o alcantarillados, ni siquiera en pequeñas cantidades. Una cantidad ínfima vertida en el subsuelo ya representa un peligro para el agua potable. Puede ser nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Es necesario evitar un contacto con el medio ambiente.
cloroformo	log Kow 2. No es de esperar una bioacumulación. Peligroso para el agua, no referencia de datos ecológicos. No es fácilmente biodegradable.
metanol	Escasamente peligroso para el agua. log Kow -0,77. No es significativamente bioacumulable. No hay reportes ecológicos en invertebrados solo en peces. Fácilmente biodegradable. Mayor de 10 000 mg/L.
etanol	log Kow -0.31. No es de esperar que se bioacumule.



Es de vital importancia para el futuro de las evaluaciones ecotoxicológicas poseer herramientas computacionales que se auxilien de las matemáticas para ahorrar tiempo, recursos materiales y financieros. De ahí, la relevancia de incrementar su complementariedad con los ensayos experimentales a la hora de emprender nuevas investigaciones, lo que demuestra su efectividad al complementarse con estos, lo que se muestra en este trabajo.

Así con el uso de los modelos matemáticos se obtienen valores de concentraciones predichos, lo que permite llevar al diseño experimental en el laboratorio un rango de concentraciones estimado más estrecho, y propicia entonces mayor rapidez, calidad y eficacia en los resultados científicos obtenidos.

Conclusiones

Los modelos matemáticos basados en la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), permitieron predecir el potencial ambiental de los agentes químicos del Laboratorio de Química Analítica de TOXIMED, resultando los mejores predichos para *Artemia sp.* el etanol, cloroformo, metanol y acetona.

Se evaluaron los agentes químicos mediante el Ensayo de Toxicidad Aguda en *Artemia sp.*, siendo los más tóxicos el fenol y la p-nitroanilina bajo las condiciones controladas de laboratorio, evidenciándose correspondencia con el modelo predictivo obtenido para este bioindicador.

Referencias Bibliográficas

- Castillo-Garit, J., Abad, C., M Casañola-Martin, G., Jones Barigye, S., Torrens, F., & Torreblanca, A. (2016). Prediction of aquatic toxicity of benzene derivatives to *Tetrahymena pyriformis* according to OECD principles. *Current Pharmaceutical Design*, 22(33), 5085-5094.
- Albert, A. L. (1997). Introducción a la toxicología ambiental. Organización Panamericana de Salud (OPS). World Health Organization (WHO), Mexico City.
- Aportela, P. (2006). Parte II. Ecotoxicología. Tóxicos y Contaminantes Ambientales. Un enfoque multidisciplinario. Editorial Academia. (pp. 181-273). La Habana.
- Arencibia Carballo, G., Tizol Correa, R. A., & Rodríguez, R. O. (2010). Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial, *Revista cubana de investigaciones pesqueras*, 27(1).
- Calleja, M. C., Persoone, G., & Geladi, P. (1994). Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(1), 69-78.
- Castillo-Garit, J. A., Casañola-Martin, G. M., Barigye, S. J., Pham-The, H., Torrens, F., & Torreblanca, A. (2017). Machine learning-based models to predict modes of toxic action of phenols to *Tetrahymena pyriformis*. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 28(9), 735-747.
- Castillo-Garit, J. A., Marrero-Ponce, Y., Escobar, J., Torrens, F., & Rotondo, R. (2008). A novel approach to predict aquatic toxicity from molecular structure. *Chemosphere*, 73(3), 415-427.
- Cortinas de Nava, C. (1999). Promoción de la prevención y reducción de riesgos químicos ambientales. INE/Semarnap. México.
- Cronin, M. T. (2004). Development and Evaluation of QSARs for Ecotoxic Endpoints: The Benzene Response-Surface Model for *Tetrahymena* Toxicity. In *Predicting Chemical Toxicity and Fate* (pp. 286-290). CRC Press.
- Duan, W., Meng, F., Cui, H., Lin, Y., Wang, G., & Wu, J. (2018). Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 441-456.
- Erazo, C. T. C., Yaguana, L. A. M., Falconí, U. G., & Argelia, L. (2013). Determinación de la concentración letal media en *artemia salina* de diez extractos hidroetanólicos de especies de plantas de zamora chinchipe determination of median lethal concentration in *artemia salina* of ten hydroethanolic extracts from plants of zamora chinchipe. *Centro de Biotecnología*, 2.
- Flórez Londoño, Y., & Martínez Muñoz, E. (2010). Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. (Undergraduate thesis) Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira.



- Hernández Martínez, E. M. (2015). Ecotoxicidad de antibacterianos con riesgo ambiental (Doctoral dissertation), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Centro de Bioactivos Químicos.
- Hernández Sorí, L. (2014). Estudios ecotoxicológicos en diferentes bioindicadores ambientales del bioplaguicida Tricosave-34 (Doctoral dissertation). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). (2022). Límites de exposición profesional para agentes químicos en España. 2022. Edición: Madrid. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/2927460/LEP+2022.pdf>
- Leis, M., Manfra, L., Taddia, L., Chicca, M., Trentini, P., & Savorelli, F. (2014). A comparative toxicity study between an autochthonous *Artemia* and a non native invasive species. *Ecotoxicology*, 23(6), 1143-1145.
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological indicators*, 69, 35-49.
- Lozano-Mercado, L. E., García-Ruapaya, C. R., Alvaríño, L., & Iannacone, J. (2017). Toxicidad aguda de tres enjuagues bucales a base de plantago major, uncaria tomentosa y eucalyptus globulus en el camarón salino *Artemia franciscana*. *The Biologist (Lima)*, 15(2).
- Manfra, L., Savorelli, F., Di Lorenzo, B., Libralato, G., Comin, S., Conti, D., ... & Migliore, L. (2015). Intercalibration of ecotoxicity testing protocols with *Artemia franciscana*. *Ecological Indicators*, 57, 41-47.
- Marín, S. D. (2017). Evaluación de riesgos en el Laboratorio de Química Analítica del Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). (Máster en "Ingeniería de Procesos Químicos"), Universidad de Oriente. Facultad de Ingeniería Química y Agronomía., Santiago de Cuba. Cuba.
- Montes De Oca Abella, O. (2016). "Riesgos químicos en un laboratorio de Química Analítica". (Trabajo de Tesis para optar por el título de Ingeniería Química.), Universidad de Oriente. Sede Mella de Santiago de Cuba, Santiago de Cuba. Cuba.
- Morales, G. C. (Ed.). (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Idrc.
- NMX-AA, N. M., & de la Federación, D. O. (1995). Norma Oficial Mexicana. Análisis de agua-Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellog (crustacea-Anostraca)-Metodo de prueba.
- Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 34-43.
- Repetto, M., & Sanz, P. (1995). Fundamentos de ecotoxicología. *Toxicología Avanzada*, 147-205.
- Rizo, P. A. (2018). Controlan derrame de petróleo en zona industrial de Matanzas. *Cubadebate*. Disponible en: <http://www.cubadebate.cu/noticias/2018/10/05/controlan-derrame-de-petroleo-en-zona-industrial-de-matanzas-fotos>
- Romero, P. R., & Cantú, A. M. (Eds.). (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología.
- Roth (2016). Ficha de Datos de Seguridad. Acetona. Versión 2.1 es.
- Schultz, T. W., Netzeva, T. I., & Cronin, M. T. (2003). Selection of data sets for QSARs: analyses of *Tetrahymena* toxicity from aromatic compounds. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 14(1), 59-81.
- Sparling, D. W. (2017). *Basics of ecotoxicology*. CRC Press.
- Urdaneta Laffita, I., Padró Rodríguez, L., Tur Naranjo, E., & Izaguirre Hernández, Y. L. (2020). Caracterización etnobotánica de la *Lawsonia inermis* L. en el Distrito José Martí Norte, Santiago de Cuba. *Revista Científica Del Amazonas*, 3(6), 6-17. <https://doi.org/10.34069/RA/2020.6.01>
- Valdés, O., Díaz, N., Cabranes, Y., Acevedo, M., Areces, A., Graña, L., & Díaz, C. (2003). Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivo. *Avicennia*, 16, 36-45.
- Vanhaecke, P., & Persoone, G. (1984). The ARC-test: A standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*: Methodology and evaluation.
- Verner, S. S. (2002). Proceedings of seminar on methodology for monitoring the marine environment, Seattle, Washington, October 1973 (No. EPA-600/4-74-004; CONF-7310106). Environmental Protection Agency, Washington, DC (USA).
- Zubairi, S. I., Othman, Z. S., Sarmidi, M. R., & Aziz, R. A. (2016). Environmental friendly bio-pesticide Rotenone extracted from *Derris* sp.: A review on the extraction method, toxicity and field effectiveness. *Jurnal Teknologi*, 78(8).