EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DE DISOLVENTES DERIVADOS DE LA BIOMASA

TESIS DOCTORAL

Estefanía Zuriaga Marco

Universidad San Jorge

Facultad de Ciencias de la Salud

Villanueva de Gállego. 2018

Dra. Laura Lomba Eraso, Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad San Jorge,

Dra. Cristina B. García García, Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad San Jorge,

Dra. Marta S. Valero Gracia, Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud y el Deporte de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación recogido en la presente memoria con título "Evaluación ecotoxicológica y toxicológica de disolventes derivados de la biomasa", presentada en la Universidad San Jorge por Dª Estefanía Zuriaga Marco, ha sido realizada bajo su dirección y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste se firma el presente certificado en Villanueva de Gállego a 4 de Octubre de 2018.

Fdo. Laura Lomba Fdo. Cristina B. García Fdo. Marta S. Valero

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que a lo largo de este tiempo me han ayudado a que este trabajo haya salido adelante, en especial:

A la **Dra. Laura Lomba**, directora de esta tesis doctoral. Por contar conmigo para que continuara con el trabajo que tú comenzaste con tu tesis, por escucharme, por tenerme siempre en cuenta para todo, por entenderme profesional y personalmente, por tenerte a mi lado, por contribuir tanto a mi felicidad…por tanto.

A la **Dra. Cristina B. García**, directora de esta tesis doctoral. Por tener siempre en cuenta mis opiniones, por tu apoyo constante y tus consejos, por no dudar nunca en bajar al laboratorio conmigo, por el entusiasmo, confianza y motivación que siempre me has transmitido, por creer en mí y siempre tener un ratito para dedicarme.

A la **Dra. Marta S. Valero**, directora de esta tesis doctoral. Por introducirme en el maravilloso mundo de las células, por enseñarme cosas nuevas, por comprender mi situación y animarme siempre para que el trabajo fuera más llevadero, por no dejarme caer en el estrés, por tus consejos.

A mi pequeña familia de la Universidad San Jorge:

A **Esther S**. Por estar siempre a mi lado, por todo lo que me valoras, por aceptarme tal y como soy, por haberme ayudado a levantar tantas veces a lo largo de este tiempo, por escucharme, por todas las veces que me haces reír, por entenderme, por los abrazos que me das y los que no, también…por toda la vida juntas.

A **Roldi**. Por hacer tan sencillas y fáciles las cosas, por estar siempre para ayudarme y escucharme, por darme tus mejores consejos, por todas tus críticas constructivas, por tu sinceridad, por las risas que nos echamos.

A **Gin**. Por elegirme, por querer que formara parte de GreenLife, por valorarme tanto, por creer en mí, por tenerme siempre en cuenta, por tus “buenos días” cada día por mi despacho, por tu apoyo incondicional.

A **Mapi**. Por la fuerza y alegría que transmites, por escucharme cuando lo he necesitado, por tus consejos, por tus ánimos continuos, por no dudar en ningún momento en echarme una mano en lo que haga falta.

A **Carmen**, por decir las cosas claras, tu vitalidad, por animarme y alegrarte de mis avances. A **Ruth**, por la alegría que transmites, por escucharme, por entenderme, por saber animarme en los últimos meses. A **Sara**, por haber escuchado mis agobios, por haberme tranquilizado, por comprenderme, por nuestros "si no fuera por estos raticos". A **Berta**, por resolverme cualquier pequeña duda por tonta que pudiera ser, por todos tus consejos, por animarme y enseñarme todo lo que sea necesario, por estar dispuesta siempre a ayudarme. Al **López**, por interesarte siempre por mis avances, por escucharme y animarme.

A las **técnicos de laboratorio**, por lo sencillo y llevadero que hacéis el trabajo experimental. Y a **T4**, por la vitalidad y alegría que siempre aportas en el laboratorio. Al resto de **compañeros de la Universidad San Jorge** que en algún momento me habéis ofrecido vuestro ánimo, entendimiento y comprensión.

Finalmente, a mi familia, este trabajo también es vuestro:

A **Miguel Ángel**. Por tu comprensión en este proceso, por los ratitos nuestros que he tenido que invertir en sacar este trabajo, por tus "celulear", "mitosar", "tesear" que tanto se incorporaron a nuestro vocabulario y me animaban a ponerme a ello, por convertir mis penas en alegrías, por saber hacerme reír, incluso en los momentos que más complicado es. Gracias cariño por la vida que estamos formando juntos.

A **mis padres**. Por guiar mi camino, por enseñarme a luchar para alcanzar mis objetivos, por ayudarme a levantar cuando me he caído, por hacerme ser mejor persona, por facilitarme la vida, por el tiempo que os he robado invirtiéndolo en este trabajo, por el gran equipo que hacemos junto a Cris, por el orgullo de teneos como padres. Nunca podré agradeceros todo lo que me dais a cambio de nada.

A **mi hermana**. Por tenerte siempre disponible para contarte mis penas y alegrías, por escucharme siempre, por tus consejos, por ser como eres, por animarme, por la admiración que me demuestras que me hace dar lo mejor de mí. Gracias Cris, porque tal y como eres, puedo decir que tengo la mejor hermana del mundo. A **mi pequeñ@ pulguit@**, porque aún no te tenemos pero ya has llenado de alegría y felicidad mi vida. A **mi cuñado**, por sentir la emoción y orgullo de este trabajo.

A **mi abuela**, porque por fin ha llegado el examen por el que tanto me preguntas, por lo orgullosa que siempre demuestras estar que me da tanta fuerza para mejorar. A **mis tíos y primos**, gracias por vuestro apoyo.

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo,

a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

ÍNDICE

Resumen **1**

Capítulo 1: Introducción **5**

1. Química sostenible 7
2. Los disolventes verdes 9
3. Evaluación de la seguridad 11
4. Evaluación (eco)toxicológica de sustancias químicas 13
5. Métodos alternativas a la experimentación animal 15
6. Ensayos de ecotoxicidad y toxicidad 16

Capítulo 2: Justificación y objetivos **27**

Capítulo 3: Material y Métodos **31**

1. Selección de los compuestos de estudio 33
2. Revisión bibliográfica de propiedades fisicoquímicas 35
3. Evaluación de ecotoxicidad 36
4. Evaluación de la toxicidad 46

Capítulo 4: Resultados y Discusión **61**

1. Selección de los compuestos de estudio 63
2. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos 69
3. Estudio de ecotoxicidad 80
4. Evaluación de la toxicidad 95
5. Comparación entre los disolventes estudiados y los disolventes tradicionales 123
6. Relaciones entre las propiedades estudiadas en los disolventes de la biomasa ... 125
7. Resultados generales: carácter verde de los disolventes estudiados 127

Capítulo 5: Conclusiones **127**

Bibliografía **131**

Anexos **151**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Información sobre los compuestos bajo estudio 35

Tabla 3.2. Clasificación de Passino y Smith para bioindicadores acuáticos 45

Tabla 4.1. Resumen de propiedades de disolventes verdes estudiadas para las tres familias seleccionadas 66

Tabla 4.2. Principales propiedades fisicoquímicas de la familia de los levulinatos 74

Tabla 4.3. Principales propiedades fisicoquímicas de la familia de los lactatos 76

Tabla 4.4. Principales propiedades fisicoquímicas de la familia de los furfurales 79

Tabla 4.5. Valores bibliográficos de concentraciones de toxicidad aguda, EC_{50}/LC_{50} (mg/L), en diferentes organismos para el ácido levulínico y derivados 82

Tabla 4.6. Valores de concentración de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) de la familia de los levulinatos para los bioensayos de *V. fischeri, D. magna* y embrión de *D. rerio* 82

Tabla 4.7. Valores bibliográficos de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) en diferentes organismos para la familia de los lactatos 85

Tabla 4.8. Valores de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) de la familia de los lactatos para los bioensayos de *V. fischeri, D. magna* y embrión de *D. rerio* 85

Tabla 4.9. Valores de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) para la familia de derivados del furfural 88

Tabla 4.10. Valores de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) de la familia de los lactatos para los bioensayos de *V. fischeri, D. magna* y embrión de *D. rerio* 89

Tabla 4.11. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos en la familia de los levulinatos para el ensayo de reducción del MTT en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT y el ensayo de inhibición de AChE 99

Tabla 4.12. Valores de porcentaje de viabilidad celular y CPT a 2000 mg/L en cada línea celular para la familia de los levulinatos 101

Tabla 4.13. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos en la familia de los lactatos para el ensayo de inhibición de AChE y el ensayo MTT en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT 107

Tabla 4.14. Valores de porcentaje de viabilidad celular y CPT a 2000 mg/L en cada línea celular para la familia de lactatos 109

Tabla 4.15. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos en la familia de los furfurales para el ensayo de inhibición de AChE y el ensayo MTT en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT 113

Tabla 4.16. Valores de viabilidad celular y CPT a 2000 mg/L en cada línea celular para la familia de los furfurales 115

Tabla 4.17. Resumen de la toxicidad observada para los once disolventes estudiados en esta tesis doctoral …… 128

Tabla A1. Valores de EC_{50} (mg/L) a 30 minutos de exposición con disolventes tradicionales en la bacteria *V. fischeri* …… 157

Tabla A2. Valores de EC_{50} (mg/L) a 24 horas de exposición con disolventes tradicionales en el crustáceo *D. magna* …… 158

Tabla A3 Valores de EC_{50} (mg/L) a 24 horas de exposición con disolventes tradicionales en el crustáceo *D. rerio* …… 159

Tabla A4. Propiedades fisicoquímicas y valores de (eco)toxicidad obtenidos en esta tesis para los once disolventes estudiados …… 161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principios de la Green Chemistry 8

Figura 1.2. Progreso en el número de publicaciones anuales relacionado con los disolventes verdes según la base de datos Web of Science 11

Figura 1.3. Imágenes de los organismos utilizados para los ensayos de ecotoxicidad 20

Figura 3.1. Esquema de la metodología seguida en esta tesis doctoral 33

Figura 3.2. Esquema del procedimiento realizado para la medida de bioluminiscencia con el organismo acuático *V. fischeri* 40

Figura 3.3. Esquema del procedimiento realizado para la medida de inmovilización de neonatos de *D. magna* 42

Figura 3.4. Imágenes representativas de embriones de *D. rerio* sanos a 24 y 48 hpf e imágenes de embriones con criterios de letalidad 43

Figura 3.5. Fundamento de la reacción llevada a cabo en la determinación de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por el método Ellman 48

Figura 3.6. Información sobre la línea celular Cos-7 50

Figura 3.7. Información sobre la línea celular A375 51

Figura 3.8. Información sobre la línea celular HaCaT 51

Figura 3.9. Reacción de reducción de MTT a formazan por enzimas deshidrogenasas 53

Figura 4.1. Compuestos y familias bajo estudio 64

Figura 4.2. Estructuras de los disolventes de la familia de los levulinatos 74

Figura 4.3. Estructuras de los disolventes de la familia de los lactatos 76

Figura 4.4. Estructuras de los disolventes de la familia de los furfurales 78

Figura 4.5. Imágenes representativas de los fenotipos de embrión de *D. rerio* encontrados después de 24 (A-D) o 48 horas (E-G) tras exposición a diferentes concentraciones del levulinato de butilo 84

Figura 4.6. Imágenes representativas de los fenotipos de embrión de *D. rerio* encontrados después de 24 (A-D) o 48 horas (E y F) tras exposición a diferentes concentraciones de lactato de butilo 87

Figura 4.7. Imágenes representativas de los fenotipos de embrión de *D. rerio* encontrados tras 24 (A-E) o 48 horas (F-G) tras exposición a diferentes concentraciones de furfural 90

Figura 4.8. Representación del punto final (EC_{50}/LC_{50} en mg/L) para cada biomodelo acuático estudiado en las familias de disolventes 92

Figura 4.9. Representación gráfica los valores de Log EC_{50} de cada disolvente en *V. fischeri, D. magna* y *D. rerio* y su clasificación de toxicidad acuática según Passino y Smith 94

Figura 4.10. Representación del porcentaje de viabilidad celular obtenida en líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de los compuestos de la familia de los levulinatos 98

Figura 4.11. Imágenes de los cultivos celulares Cos-7, HaCaT y A375 en condiciones basales y tras exposición durante 24 horas a 2000 mg/L de levulinato de butilo 102

Figura 4.12. Imagen de electroforesis de ADN de células A375 tras 24 horas de exposición a 2000 mg/L de cada compuesto de la familia de los levulinatos en gel de agarosa (1,2%) teñido con Gel-Red (Biotium®) 105

Figura 4.13. Representación de la citotoxicidad basal obtenida en líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de los compuestos de la familia de los lactatos 106

Figura 4.14. Imágenes de los cultivos celulares Cos-7, HaCaT y A375 en condiciones basales y tras exposición durante 24 horas a 2000 mg/L de lactato de etilo 110

Figura 4.15. Representación de la citotoxicidad basal obtenida en líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de los compuestos de la familia de los furfurales 112

Figura 4.16. Imágenes de los cultivos celulares Cos-7, HaCaT y A375 en condiciones basales y tras exposición durante 24 horas a 2000 mg/L de alcohol furfurílico 117

Figura 4.17. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa para todos los compuestos bajo estudio de esta tesis doctoral 119

Figura 4.18. Representación del valor de IC_{50} (mg/L) obtenido en el ensayo de reducción del MTT tras exposición de los compuestos bajo estudio durante 24 horas en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT 121

Figura A1. Imágenes representativas de los fenotipos de embriones de *D. rerio* expuestos a diferentes concentraciones de los disolventes de la familia de los levulinatos 153

Figura A2. Imágenes representativas de los fenotipos de embriones de *D. rerio* expuestos a diferentes concentraciones de los disolventes de la familia de los lactatos 154

Figura A3. Imágenes representativas de los fenotipos de embriones de *D. rerio* expuestos a diferentes concentraciones de los disolventes de la familia del furfural 155

Resumen

En los últimos años, se ha producido un notable aumento en el uso de productos químicos, cuyas propiedades toxicológicas no han sido estudiadas, que pueden resultar dañinos para el medio ambiente y los seres humanos. Dentro de estos productos se incluyen los disolventes, fundamentales en la industria química por las numerosas ventajas que presentan. Por tanto, una buena opción es el uso del denominado "disolvente verde", el cual se basa en el cumplimiento de los principios de la *Green Chemistry.* Un disolvente verde ideal debe tener una baja presión de vapor, un punto de ebullición alto, debe ser no tóxico y reciclable, ser biodegradable, ser capaz de disolver tantos compuestos químicos como sea posible, barato y proceder de recursos renovables. Por tanto, este tipo de disolventes trata de sustituir a los disolventes tradicionales.

En el presente trabajo se seleccionaron once disolventes derivados de la biomasa, divididos en tres familias de compuestos relacionados estructuralmente: familia de los levulinatos (ácido levulínico, levulinato de metilo, levulinato de etilo y levulinato de butilo), familia de los lactatos (lactato de metilo, lactato de etilo y lactato de butilo) y familia de los furfurales (furfural, 5-metilfurfural, alcohol furfurílico y alcohol tetrahidrofurfurílico). Todos ellos han sido considerados como verdes por su procedencia y sus propiedades fisicoquímicas, por lo que su uso se ha extendido en los últimos años. Sin embargo, no existen estudios completos sobre el efecto que estos disolventes pueden tener en el medio ambiente y en la salud humana. Por ello, se realizó una evaluación de ecotoxicidad y toxicidad de los mismos con el fin de disponer de información suficiente para poder clasificar estos disolventes como verdes.

Se evaluó la ecotoxicidad en tres organismos acuáticos (*Daphnia magna, Vibrio fischeri* y *Danio rerio*) en diferentes niveles de la cadena trófica para conocer el impacto de estas sustancias en el medio ambiente. A fin de conocer el efecto en la salud humana, se estudió el posible potencial neurotóxico, genotóxico y el efecto sobre líneas celulares sanas (Cos-7 y HaCaT) y tumorales (A375) de los compuestos a través de diferentes pruebas experimentales. Los resultados se relacionaron con

propiedades fisicoquímicas para conocer cómo pueden describir el comportamiento tóxico de los disolventes.

El ácido levulínico, los lactatos de metilo y etilo y los alcoholes furfurílico y tetrahidrofurfurílico fueron los disolventes que resultaron más inofensivos para los tres organismos acuáticos estudiados. Sin embargo, todos los disolventes produjeron efectos teratogénicos en embriones de *D. rerio* dependientes de la concentración testada. Estos efectos fueron menos acusados en la familia de los lactatos y para el alcohol tetrahidrofurfurílico.

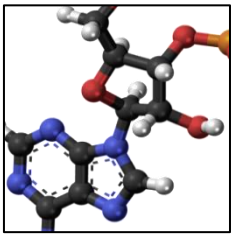
Todos los disolventes mostraron un bajo perfil neurotóxico y sólo el levulinato de etilo presentó indicios de genotoxicidad a 24 horas de ensayo. Los disolventes de la familia de los levulinatos, de los lactatos y el alcohol tetrahidrofurfurílico no presentaron toxicidad celular en las líneas utilizadas aunque el efecto de citotoxicidad fue claramente dependiente de concentración. Sin embargo, el contacto con los disolventes mostró efectos negativos en los cultivos celulares, tales como disminución en la densidad celular, alteraciones de morfología o efectos de estrés celular, menos acusados para los disolventes de la familia lactatos y alcohol tetrahidrofurfurílico.

En la mayor parte de los ensayos se obtuvo una relación entre la estructura química del disolvente y el efecto tóxico generado, de modo que éste fue mayor cuando los disolventes tenían sustituyentes alquílicos de mayor longitud. Además, se comprobó que la solubilidad, la agregación y la hidrofobicidad son las propiedades que mejor describieron el comportamiento tóxico para la mayor parte de los disolventes.

Este trabajo ha sido el primer estudio en realizar una evaluación completa de la toxicidad de los once disolventes derivados de la biomasa y ha permitido disponer de información para poder clasificar estos disolventes por su bondad medioambiental y para la salud humana con garantías y rigor científico.

1

Introducción





1. QUÍMICA SOSTENIBLE

Los compuestos químicos son la base de nuestra vida. Existen en nosotros, los encontramos en todo lo que nos rodea y en cada producto que adquirimos. En los últimos años, el avance de la industria química y farmacéutica ha generado un notable aumento en el uso de productos químicos, muchas de estas sustancias, son compuestos nuevos y mezclas, de las cuales se dispone de poca información pudiendo resultar dañinos para el medio ambiente y los seres humanos. La producción mundial de sustancias químicas ha pasado del millón de toneladas en 1930 a varios cientos de millones de toneladas en la actualidad [1]. Prácticamente todas las sustancias químicas se liberan al medio ambiente contaminándolo, lo que provoca la exposición de los seres humanos y otros organismos a estos productos. La preocupación pública ha generado que la seguridad del uso y la manipulación de productos químicos sea un aspecto de gran importancia.

Es por ello que en 1987 la *United Nations Commission on Environment and Development (Bruntland Commission)* empezó a definir el desarrollo sostenible y ecológico como "*…aquel que permite cumplir con las necesidades del presente sin comprometer la habilidad de las futuras generaciones a alcanzar sus propias necesidades*" [1]. Es a partir de este momento cuando gobiernos, Organizaciones No Gubernamentales (ONGs), el sector industrial y la sociedad en general han comenzado a considerar cómo alcanzar el desarrollo sostenible. Dos de los aspectos importantes del desarrollo sostenible desde la perspectiva química y energética son: hasta cuándo podremos usar los combustibles fósiles y cuántos residuos podremos liberar de manera segura al medio ambiente. En realidad, se desconoce la respuesta pero existe un acuerdo generalizado respecto al desarrollo de nuevos recursos renovables y reducción de la contaminación.

A principio de los años 90, la Agencia de Protección Ambiental en EEUU (EPA) comenzó a utilizar el término *Green Chemistry* para "*promover tecnologías de*

innovación química que reduzcan o eliminen el uso o generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y uso de productos químicos". En los últimos 20 años, la *Green Chemistry* ha llegado a ser reconocida tanto como una cultura como un procedimiento para alcanzar la sostenibilidad [2]. Se basa en 12 principios propuestos por *Anastas y Warner* que pretenden minimizar los impactos ambientales y reducir la toxicidad de los compuestos químicos. Los principios fundamentales en los que se basa la *Green Chemistry* se resumen en la figura 1.1 [3].

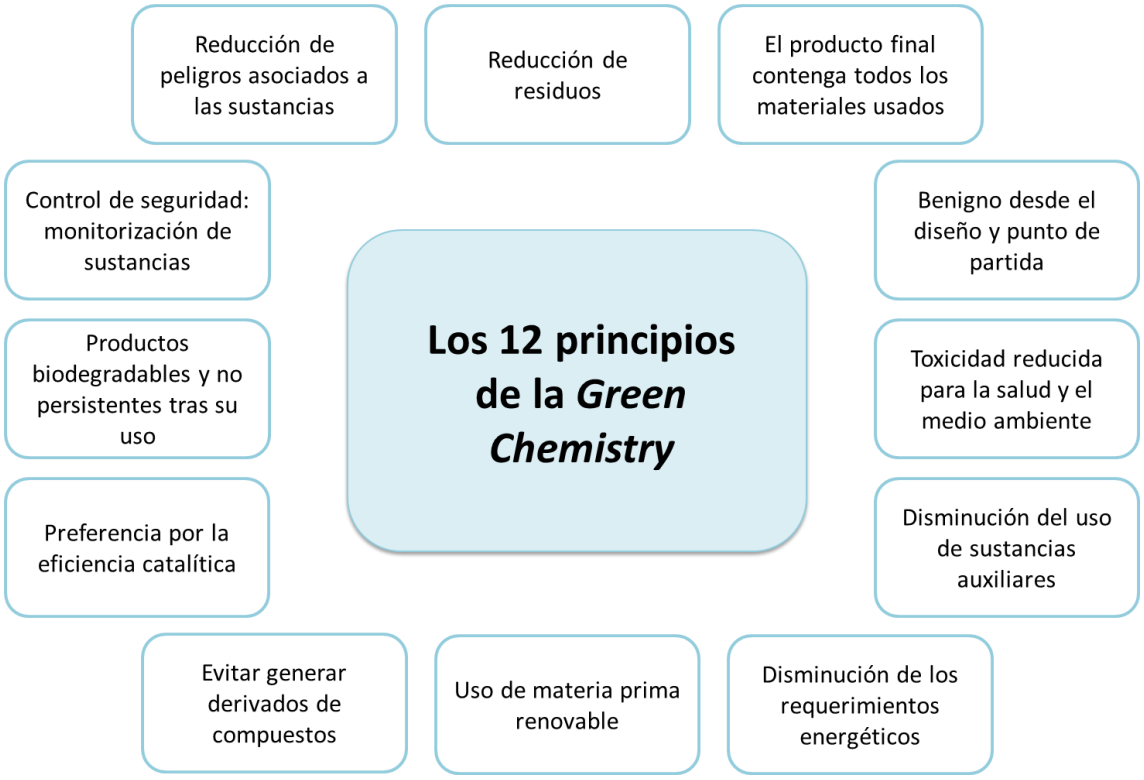


Figura 1.1. Principios de la Green Chemistry [3].

Uno de los doce principios de la *Green Chemistry* hace referencia a la utilización de disolventes y sustancias auxiliares: "*siempre que sea posible se debe evitar la utilización de disolventes"*. Sin embargo, el uso de disolventes es fundamental en la industria y en laboratorio, ya que sus ventajas son tan numerosas e importantes que difícilmente se puede remplazar completamente al disolvente del proceso industrial [4]. Los disolventes se utilizan tanto solos como en combinación con otros compuestos, para disolver materias primas o como agentes que pueden disolver otras

sustancias. Permiten transferir masa y calor y, además, facilitan la separación y purificación de diferentes productos. A menudo son el componente primario en productos de limpieza, adhesivos y revestimientos (pinturas, barnices y tintes). En la mayor parte de ocasiones, los disolventes tienen una naturaleza orgánica. Dado que eliminarlos es complicado, se debe intentar utilizar sustancias inocuas en su lugar [5].

Actualmente, se están desarrollando nuevas líneas de investigación basadas en los principios propuestos por Anastas y Warner que definen la *Green Chemistry* [6]. Los disolventes no pueden ser eliminados siempre de los procesos químicos, por ello, se precisa de la utilización de nuevos disolventes menos tóxicos y peligrosos pero que preserven la eficacia de su función [7], por lo que es de vital importancia el diseño de productos químicos que no generen toxicidad para la salud humana y el medio ambiente [5]. Por tanto, una buena opción es el uso de los denominados disolventes verdes.

2. LOS DISOLVENTES VERDES

Un disolvente verde ideal debe tener una baja presión de vapor, un punto de ebullición alto, no debe ser tóxico y debe ser reciclable, biodegradable (y sus productos de degradación deben igualmente presentar ausencia de toxicidad). Además, es deseable que sea capaz de disolver tantos compuestos químicos como sea posible, barato y proceder de recursos renovables. Este tipo de disolventes trata de sustituir a los disolventes tradicionales para mejorar las propiedades fisicoquímicas y reducir su impacto en el medio ambiente y la salud humana [8]. Sin embargo, no existe el disolvente verde perfecto que pueda utilizarse en todas las circunstancias.

Dado que un determinado disolvente no sirve para todos los procesos químicos existentes, es necesario el diseño de nuevos disolventes y lo ideal es que éste sea un disolvente verde. En este punto, surgiría una cuestión: “¿Cómo se sabe que el

disolvente nuevo es un disolvente denominado verde?". Para ello, *P.G. Jessop* [9] plantea una serie de aspectos a tener en cuenta:

1. Obtener la mayor información posible de los nuevos disolventes catalogados como disolventes verdes.
2. Reconocer un disolvente verde.
3. Encontrar un disolvente polar aprótico fácil de eliminar.
4. Eliminar los disolventes por destilación.

En la actualidad, existen muchos disolventes que se han considerado como verdes sin haberse realizado estudios previos adecuados, debido a que estos procesos pueden llevar una importante inversión de tiempo y dinero. Por lo tanto, otro reto que se plantea es encontrar métodos que permitan evaluar los efectos ambientales y sobre la salud humana de este tipo de disolventes. Aunque actualmente ya existen algunos métodos, raramente se utilizan en la práctica para determinar si un disolvente es verde o no [9].

La *Green Chemistry* considera cuatro grandes grupos de compuestos como disolventes verdes: los disolventes fluorados, los líquidos iónicos, los fluidos supercríticos y los disolventes derivados de fuentes renovables [10]. En los últimos años, se ha considerado otro grupo candidato a considerarse verde: se trata de los disolventes DES (*Deep Eutectic Solvents*), de características análogas a los líquidos iónicos [11].

Todos estos disolventes han surgido en el campo de la ciencia y los procesos industriales, y generan nuevas opciones en la búsqueda y desarrollo de nuevas aplicaciones en diferentes áreas. En la figura 1.2 se observa cómo el número de publicaciones de las diferentes familias de disolventes verdes ha aumentado considerablemente en las dos últimas décadas, siendo muy numerosas las relativas a los líquidos iónicos.

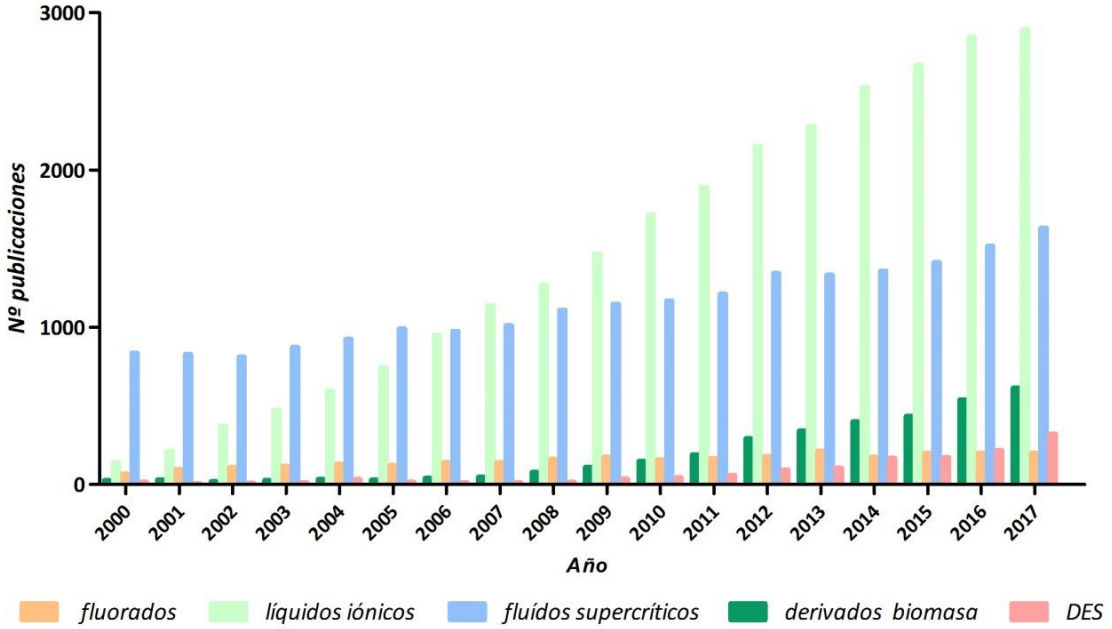


Figura 1.2. Progreso en el número de publicaciones anuales relacionado con los disolventes verdes según la base de datos Web of Science.

No cabe duda de que para poder utilizar estos compuestos en cualquier proceso químico es necesario disponer de la máxima información posible previamente a su uso en cualquier aplicación química. Esta información debe ir encaminada a mejorar y ampliar las posibles aplicaciones de los compuestos desde el punto de vista industrial pero teniendo en cuenta las ideas de la *Green Chemistry*. La aplicación de los nuevos compuestos en la industria debe estar también condicionada por sus características medioambientales y de salud. Es por todo esto que deberán emplearse diversas metodologías que permitan evaluar el riesgo por la exposición a estos compuestos.

3. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD

La exposición a compuestos químicos de origen industrial, con posible potencial tóxico, es cada vez más frecuente e intensa por la contaminación ambiental urbana y su impacto en la salud humana. Por otro lado, la contaminación de espacios naturales

y agrícolas, genera un impacto directo en la fauna y flora provocando posibles efectos nocivos en humanos por verse expuestos a los contaminantes acumulados a lo largo de la cadena trófica.

Hasta hace dos décadas no se disponía de información suficiente sobre los efectos en la salud humana y en el medio ambiente de muchas de las sustancias existentes, o al menos, lo que se conocía era de manera parcial. La creciente preocupación social ha dado lugar a que las autoridades de los estados miembros de la Unión Europea se hayan cuestionado la política desarrollada hasta entonces sobre la gestión y control de productos químicos [12].

La evaluación del peligro de una sustancia química consiste en evaluar las propiedades intrínsecas de la misma, por lo que debe tenerse en cuenta la valoración de los peligros para la salud humana, para el medio ambiente, los riesgos asociados a sus propiedades fisicoquímicas y los efectos de las sustancias Persistentes, Bioacumulables y Tóxicas (PBT) [12].

En el año 2006 entra en vigor el Reglamento Europeo REACH (EC1907/2006, Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas). Entre las finalidades de dicho Reglamento cabe destacar la que pretende garantizar la protección de la salud humana y del medio ambiente a través de una mejor y más temprana identificación de los factores intrínsecos y potencialmente tóxicos de las sustancias químicas. Un aspecto clave de la regulación REACH es la sustitución progresiva de los productos químicos por alternativas adecuadas. Este Reglamento incluye la necesidad de caracterizar los efectos tóxicos de las sustancias químicas y de evaluar los peligros asociados a las mismas. Es por ello que es de suma importancia disponer de información sobre las propiedades fisicoquímicas, la ecotoxicología y la toxicología de las sustancias [13]. De hecho, el REACH exige diferentes niveles de estudio sobre información de las sustancias químicas en función de la producción anual de cada una. Así, por ejemplo, ante producciones entre 10 y 100 toneladas, los ensayos de toxicidad y ecotoxicidad exigidos, como por ejemplo la toxicidad aguda por vía cutánea o por inhalación, son muchos más amplios que los incluidos para

producciones menores (entre 1 y 10 toneladas) [12, 14]. En caso de que no se disponga de dicha información será necesario realizar los ensayos adecuados para obtenerla. El objetivo final es disponer de la máxima información posible que sea de utilidad para tomar decisiones sobre las sustancias químicas cuando proceda.

Por tanto, la situación actual obliga a analizar científicamente el impacto sobre la salud humana a través del desarrollo de metodologías objetivas que permitan calificar y cuantificar el riesgo que supone la presencia de sustancias químicas en diferentes compartimentos del ecosistema. La aplicación de la normativa REACH implica un gran aumento de ensayos de toxicidad de compuestos químicos.

4. EVALUACIÓN (ECO)TOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

El uso generalizado de sustancias químicas y su continua liberación al medio ambiente hacen que las vías de exposición sean numerosas y variadas. En la mayoría de las ocasiones, las evaluaciones previas a la comercialización de sustancias químicas no incluyen estudios toxicológicos exhaustivos, haciendo complicado predecir el impacto biológico real y desconociéndose los mecanismos de acción tóxicos concretos [15]. Es, por tanto, de vital importancia el estudio de efectos adversos de ciertas sustancias químicas de uso extendido y también profundizar en los riesgos derivados por exposición a las mismas.

La toxicología es la ciencia encargada de la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones. Esta ciencia abarca desde estudios de investigación básica sobre el mecanismo de los agentes tóxicos hasta la interpretación de las propiedades toxicológicas. Por otro lado, la ecotoxicología implica el estudio de los desequilibrios que se generan en los ecosistemas a causa de agentes tóxicos [16]. En ambos campos,

se hace uso de pruebas que permiten valorar la toxicidad de las sustancias y observar sus efectos.

La evaluación de la toxicidad de sustancias químicas se ha basado históricamente en el empleo de ensayos *in vivo,* pero es evidente que la toxicología no ha quedado al margen de los progresos científicos que se han dado en las últimas décadas. Desde hace tiempo, la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) proporciona procedimientos armonizados para la aceptación de la toxicidad, evitando la duplicación de ensayos y reduciendo los costes de la valoración de riesgo.

La valoración del riesgo asociado a la exposición química, necesita de una caracterización de estados patológicos de animales de experimentación, lo cual hace que se requiera un alto número de animales debido a que cada año aparecen numerosos compuestos químicos nuevos [17, 18]. La EPA revisó en 2004 los métodos clásicos de evaluación de sustancias químicas. También la OMS (Organización Mundial por la Salud) ha influido en las normativas europeas y la experimentación con animales a través de la Directiva CLP (Clasificación, Etiquetado y Envasado de sustancias y mezclas) [13, 19].

Por tanto, con la idea de modernizar la visión de los ensayos de toxicidad se ha avanzado en el desarrollo y uso de tests *in vitro* diseñados como alternativa a la experimentación animal. Al mismo tiempo, la valoración de la toxicidad en vertebrados en Europa se encuentra regulada por la normativa REACH y por la Directiva relativa a la protección de animales para propósitos científicos del Parlamento Europeo [20]. Con el fin de reducir el número de pruebas con animales, ambos promueven firmemente el uso de enfoques alternativos, tales como ensayos *in vitro*, análisis *in silico* o tests *in vivo* en estadios tempranos de desarrollo (embriones o larvas). Además, en 2008 se aprobó el Reglamento CE 440/2008, modificado por el UE 260/2014 en el que se establecen los métodos de ensayo disponibles de acuerdo a la normativa REACH [12, 21].

5. MÉTODOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

En los últimos 20 años en Europa se ha apostado por el uso de métodos alternativos a la experimentación animal para el estudio de la toxicidad de las sustancias. Estos métodos se basan en el principio de las 3R: reemplazar completamente la necesidad de experimentación animal, reducir el número de animales requeridos y refinar para disminuir el dolor, angustia o sufrimiento producido en los animales de experimentación o mejorar su bienestar [22]. Los campos en los que se da el uso de este tipo de métodos son la educación, la investigación biomédica y la valoración de toxicidad de sustancias químicas [16].

Entre los diversos métodos se encuentran aquellos de reducción del número de animales y refinamiento del procedimiento, que hacen uso de la información previa disponible para perfeccionar el diseño experimental. Por otro lado, se encuentran los métodos de reemplazo que no utilizan ninguna especie de animales protegidos. En este grupo destacan aquellos que promueven el uso de [23, 24]:

- Organismos inferiores no protegidos: bacterias, hongos, protozoos, algas, plantas o animales invertebrados. Pese a ser organismos de niveles inferiores de la cadena trófica, su uso permite conocer la sensibilidad de diferentes especies a las sustancias químicas y priorizar el estudio más profundo en determinadas áreas donde se desarrollan estas especies [25].

- Vertebrados en etapas iniciales de su desarrollo embrionario: peces, anfibios o larvas. En especial, los peces y larvas en estadios tempranos de vida son modelos muy adecuados para el estudio de toxicidad de sustancias químicas [26, 27] ya que no sufren apenas daño o estrés en comparación con los peces juveniles o adultos y su toxicidad aguda se correlaciona altamente con la de adultos [28].

- Métodos *in vitro*: órganos, explantes, reagregados, cultivos primarios de células o líneas celulares. La toxicidad aguda sistémica puede ser consecuencia de la

toxicidad a nivel celular producida por la interacción de tóxicos con estructuras que desempeñen un papel importante en la función, proliferación y supervivencia de las células, independientemente de si están en condiciones *in vivo* o *in vitro* [29, 30]. Por tanto, los efectos tóxicos agudos de una gran cantidad de compuestos químicos podrán ser ensayados en los sistemas de cultivo celular.

- Modelos matemáticos de predicción: cinética ambiental de compuestos químicos, métodos *in silico*, estudios farmacocinéticos (PB-PK) o Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR). La química computacional hace uso de resultados experimentales y permite complementar la información. Algunos métodos, como son los QSAR, permiten relacionar la estructura química y las propiedades fisicoquímicas con la actividad biológica en diferentes organismos de modo que nos permita predecir toxicidades [31, 32].

Por tanto, en la actualidad, la comunidad científica dispone de ensayos suficientes para la evaluación de la toxicidad que las sustancias químicas liberadas al medio ambiente pueden ocasionar a organismos, ecosistemas y humanos.

6. ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD Y TOXICIDAD

Una de las maneras existentes de evaluar el peligro y cuantificar el riesgo asociado a la exposición a una sustancia química es la evaluación concentración-respuesta [33]. Existen diversas formas de determinar la toxicidad:

- Uno de los indicadores comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba para ver los efectos de letalidad aguda, estimando la concentración letal media (LC_{50}), aquella que produce la letalidad del 50% de la muestra [34].
- Para efectos no letales como son los bioquímicos, fisiológicos, reproductivos, se busca la concentración efectiva media (EC_{50}), es decir

aquella que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50% de la población [34].

Esta evaluación permite conocer los efectos sobre el medio ambiente y la salud humana a distintos niveles de exposición. Es por ello que el desarrollo, validación y uso de biomarcadores como herramientas de información para la evaluación de factores de riesgos asociados a la exposición a agentes ambientales se incrementa cada día por la necesidad de conocer los efectos adversos generados por los diferentes entornos y estilos de vida [35].

Los biomarcadores son parámetros biológicos u organismos específicos que ofrecen información sobre el estado normal o patológico de un individuo o población. Se utilizan para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada a través de una respuesta funcional o fisiológica que se da a nivel celular o molecular y que está asociada a una elevada probabilidad de desarrollar daños [36]. Teniendo en cuenta esto, se desarrollan pruebas de toxicidad específicas a través de ensayos biológicos o bioensayos que sirvan como herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de sustancias sobre biomarcadores bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos como pueden ser la letalidad, crecimiento, proliferación, cambios morfológicos, fisiológicos, histológicos e incluso, de comportamiento [33].

Fundamentalmente existen dos grupos de bioensayos o pruebas de toxicidad. En primer lugar, el formado por las pruebas de toxicidad aguda, ensayos relativamente simples y de corta duración. Estas pruebas permiten realizar una valoración de toxicidad rápida o determinar la sensibilidad relativa de diferentes especies a los compuestos químicos objeto de ensayo. En segundo lugar, se encuentra el grupo constituido por las pruebas de toxicidad crónica, más complejas y que requieren de más tiempo que las pruebas mencionadas con anterioridad. Además, están diseñadas para ciclos de vida de especies particulares permitiendo adicionalmente, poder evaluar

efectos a más largo plazo como por ejemplo, la teratogenicidad o la carcinogenicidad [37]. Ambos tipos de pruebas permiten determinar si un producto químico podría afectar a los animales y plantas en función de la cantidad en la que se encuentren [38].

Los ensayos de toxicidad aguda tienden a ser más utilizados que los de toxicidad crónica. Esto es debido a estar basados en métodos disponibles rutinariamente, ser aplicables a una amplia variedad de compuestos o por ser más simples y rápidos para generar resultados [25]. Además, permiten la construcción de bases de datos para comparar la sensibilidad de las especies a los contaminantes o de la toxicidad de un grupo de compuestos en una especie en particular de manera rápida y barata; también se pueden identificar y evaluar los efectos potenciales de diferentes contaminantes sobre componentes biológicos. Sin embargo, las medidas de toxicidad aguda no detectan los efectos a largo plazo (crecimiento o reproducción) de las especies o daños a nivel poblacional.

Dada la importancia de los resultados a obtener en pruebas de este tipo y la introducción de nuevas especies en los bioensayos, se ha visto la necesidad de desarrollar protocolos estandarizados. Cuando se aumenta el número de especies analizadas en la valoración de la toxicidad de una sustancia, se puede tener una idea de su mecanismo de acción, biodegradabilidad, toxicidad específica para cada órgano y efectos potenciales tanto agudos como crónicos [37].

Se ha tratado de hacer correlaciones entre los resultados de evaluación de toxicidad obtenidos a partir de la exposición de diversas especies a distintos compuestos sin alcanzar un éxito evidente. Incluso, existe mayor dificultad para extrapolar los resultados obtenidos de unas especies a otras, o utilizarlos para hacer predicciones sobre los efectos nocivos dañinos que un tóxico podría tener sobre el ser humano y el medio ambiente [39].

Por tanto, el uso de varios biomarcadores, que ofrezcan información complementaria, permite caracterizar el riesgo al dar información cualitativa y cuantitativa describiendo el efecto por la exposición a una sustancia química, identificación de los daños y la evaluación de dosis-respuesta. Además, es importante

tener en cuenta siempre la información previa disponible en humanos, diferentes especies y sistemas *in vitro* [40, 41].

No es fácil determinar si la toxicidad relativa *in vitro* de las sustancias químicas es comparable a sus toxicidades relativas *in vivo*, pues en el sistema *in vivo* intervienen muchos factores como pueden ser la toxicocinética, el metabolismo o los mecanismos de reparación y defensa. Por consiguiente, la concordancia entre las toxicidades relativas *in vitro* e *in vivo* es meramente orientativa. Pese a los muchos problemas y dificultades que plantea la extrapolación de *in vitro* a *in vivo*, los ensayos *in vitro* están resultando muy valiosos porque su realización es sencilla y poco costosa y porque pueden utilizarse como métodos de detección de la toxicidad de compuestos en las fases tempranas de su desarrollo. Los resultados obtenidos *in vitro* únicamente pueden dar indicaciones sobre el riesgo potencial en la salud humana y en el medio ambiente de las sustancias probadas [42].

En general, es muy difícil demostrar el efecto real que las sustancias químicas producen en el medio ambiente y la salud humana, ya que éstas suelen estar presentes de manera simultánea, produciendo exposiciones múltiples y a lo largo de la vida de las personas, provocando problemas en la salud a corto y largo plazo. Sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos ofrecen una información de gran utilidad en el cribado inicial de estos compuestos químicos [43]. La medida de la ecotoxicidad y toxicidad a través de diferentes bioensayos permite conocer el posible riesgo provocado por las sustancias químicas en el medio ambiente y la salud humana.

6.1 Ensayos de medida de la ecotoxicidad

Los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, son la fuente de información predominante para la evaluación de efectos tóxicos de sustancias químicas. A continuación se muestra información sobre tres organismos ampliamente utilizados como modelos experimentales para la medida de la ecotoxicidad. En la figura 1.3 se muestran imágenes representativas de los tres organismos. Con el fin de obtener

mayor información, los organismos se encuentran a diferentes niveles de la cadena trófica: bacteria, invertebrado y vertebrado. Cuando se aumenta el número de especies probadas en la valoración de la toxicidad de una sustancia, se puede tener una idea de su mecanismo de acción, biodegradabilidad, toxicidad específica para cada órgano y efectos potenciales tanto agudos como crónicos [37].



Vibrio fischeri *Daphnia magna* *Danio rerio*

Figura 1.3. Imágenes de los organismos utilizados para los ensayos de ecotoxicidad.

6.1.1. Vibrio fischeri

Aliivibrio fischeri, conocida fundamentalmente como *Vibrio fischeri (V. fischeri),* es una bacteria marina luminiscente gram negativa, anaerobia facultativa de la familia *Vibrionaceae*, cuya principal característica es la producción de luz por el propio organismo, conocida como bioluminiscencia. En las condiciones ambientales adecuadas *V. fischeri* emite luz de manera natural, para ello requiere de unas concentraciones de oxígeno superiores a los 0,5 mg/L. La presencia de oxígeno es, por tanto, un requisito imprescindible en esta emisión [44].

La bioluminiscencia es la luz emitida por estos organismos vivos como resultado de su actividad bioquímica o enzimática. Las enzimas que catalizan las reacciones de bioluminiscencia reciben el nombre genérico de luciferasas. En *V. fischeri,* esta reacción se encuentra ligada a la cadena de transporte de electrones y, por tanto, es un indicativo del estado metabólico de la bacteria. El contacto con sustancias tóxicas puede derivar en una alteración de la respiración celular, modificando la síntesis de proteínas y lípidos, y por ende, la emisión de luminiscencia [45].

Es importante destacar su gran estabilidad en la emisión de luz y su alta sensibilidad a una amplia variedad de sustancias tóxicas. Es por ello que esta bacteria se utiliza como organismo biomodelo para evaluar la toxicidad de sustancias en agua marina [33, 44].

6.1.2. Daphnia magna

Daphnia magna (D. magna) es una especie que pertenece a la familia *Daphnidae*, incluida en la clase *Crustacea*. Se trata de un organismo que se encuentra en aguas dulces y es especialmente abundante en charcas temporales situadas a baja y media altura sobre el nivel del mar. Son crustáceos de tamaño pequeño, variando su longitud entre 0,2 y 18 mm, y dicho tamaño tiene dependencia con la disponibilidad de alimento en el medio en el que viven. Además, su coloración, entre anaranjada o parda, también varía en función de las condiciones de oxígeno disuelto y salinidad en las que se encuentren [46].

Es esperable que los productos químicos puedan alterar el comportamiento de los dáfnidos, tanto a la hora de filtrar el agua como en sus procesos fisiológicos, pudiendo causar cambios en su organismo y haciendo que sean más vulnerables al medio en el que viven [47, 48]. Por ello, los ensayos de toxicidad con *D. magna* permiten determinar el efecto potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, etc.

Se trata de un bioindicador ampliamente utilizado en test de medidas en ecotoxicidad acuática, tanto aguda como crónica, debido a su alta sensibilidad a muchas sustancias químicas [49]. Los dáfnidos son el mejor indicador para determinar el peligro potencial en los ambientes acuáticos continentales [50]. Es por ello que las especies del género *Daphnia* han sido muy reconocidas como una especie estándar en bioensayos de ecotoxicidad por organizaciones internacionales como la U.S. EPA, la Comunidad Económica Europea (*C.E.E.*) y la OCDE. Estos organismos son los

invertebrados principales en cualquier batería de test de toxicidad en evaluaciones iniciales de impacto ambiental de efluentes [38].

6.1.3. Danio rerio

Danio rerio (D. rerio), también conocido como *Brachydanio rerio* o comúnmente como pez cebra, pertenece al género *Brachydanio* (Familia *Cypirinidae*). Se trata de un pez tropical ovíparo de agua dulce, de tamaño pequeño (entre 4 y 6 cm de longitud y entre 2 y 3 gramos de peso) y con preferencia por aguas en calma o con bajo movimiento y ligeramente alcalinas (pH aproximado a 8) [51, 52].

El pez cebra es un organismo que ofrece numerosas ventajas técnicas y prácticas para estudiar los principales procesos biológicos y sus mecanismos [53]. El embrión de este pez constituye un excelente modelo animal para estudiar y evaluar la toxicidad de compuestos, ya que se trata de un organismo vertebrado que presenta un proceso de embriogénesis muy rápido (72 horas post-fecundación, hpf) y cuya transparencia permite la observación microscópica de sus órganos a tiempo real [26].

Por ello, el uso de estos embriones se ha extendido en los últimos años para valorar el daño ambiental en vertebrados y cuando el objetivo consiste en identificar los efectos adversos de la exposición química en el medio ambiente acuático [26, 27].

6.2 Ensayos de medida de la toxicidad

Existe una amplia variedad de ensayos experimentales que permiten valorar las consecuencias derivadas de la exposición a sustancias químicas. El uso de cultivos celulares es un buen método por la relación existente entre las respuestas *in vitro* y la predicción de toxicidad en humanos [54, 55]. Por otro lado, los ensayos sobre actividades enzimáticas y daño en ADN, ofrecen también información sobre la posible toxicidad molecular y alteraciones bioquímicas que los organismos o el ser humano pueden sufrir ante la exposición a ciertas sustancias [16]. Todos estos tipos de ensayos permiten evaluar de manera conjunta la toxicidad de las sustancias químicas y conocer los efectos que ocasionan a distintos niveles de organización biológica.

6.2.1. Neurotoxicidad

La neurotoxicidad hace referencia a alteraciones funcionales, estructurales y bioquímicas producidas en el Sistema Nervioso como consecuencia de exposición a un agente tóxico y que puede provocar efectos adversos. Todas las partes del sistema nervioso son susceptibles a daño tóxico [56]. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) juega un papel importante en la respuesta nerviosa, es la responsable de la sinapsis colinérgica y otros procesos nerviosos, por lo que la medida de su inhibición se considera apropiada como posible indicador del potencial neurotóxico de sustancias químicas [57].

El ensayo de inhibición de la enzima AChE se realiza utilizando la enzima purificada de anguila eléctrica (*Electrophoresus electricus*) cuyo centro activo es altamente conocido. La enzima es parte esencial del sistema nervioso de la mayor parte de organismos superiores, incluidos los seres humanos, y además, está conservada en todos los organismos [42, 58]. Por tanto, la AChE resulta un biomarcador específico de neurotoxicidad y la medida de su inhibición permite la extrapolación de información sobre la toxicidad que las sustancias químicas pueden genera en el sistema nervioso.

6.2.2. Citotoxicidad

La citotoxicidad se puede definir como la acción que genera efectos adversos, alteraciones de estructuras y propiedades esenciales para la función celular, proliferación o supervivencia. La exposición a xenobióticos puede producir daño en una o varias dianas celulares pudiendo acarrear consecuencias biológicas [59].

Los estudios que se realizan en sistemas celulares utilizan la célula como unidad de estudio en lugar de un organismo, observando las alteraciones en las funciones celulares básicas al ser expuestas a sustancias químicas. En la actualidad, las líneas celulares de mamífero son las más utilizadas en las pruebas de citotoxicidad [60]. Las células responden a los factores externos a través de rutas específicas de respuesta a estrés tratando de mantener o restablecer la homeostasis. Estas vías de respuesta, que

se encuentran presentes en todos los tipos de células, se activan a niveles de exposición de sustancias más bajos que aquellos que causan lesiones observables. Es por ello, que la medida de perturbación de estas rutas funcionará como marcador de un posible daño patológico, teniendo en cuenta que esa perturbación se activa debido a efectos nocivos de exposición de una sustancia [61].

El objetivo de las pruebas de toxicidad con líneas celulares no sólo permite conocer la toxicidad aguda sino los cambios bioquímicos y morfológicos que pueden darse en la célula debido al contacto con agentes externos. Por tanto, el uso de estos estudios resulta de interés para poder definir perfiles tóxicos de sustancias químicas.

6.2.3. Genotoxicidad

La exposición a ciertas sustancias químicas puede provocar respuestas que dañen el material genético. La genotoxicología es la disciplina de la toxicología que pretende preservar la genética humana de la acción de las distintas sustancias genotóxicas, incluyéndose las que tengan efectos mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos. Aunque la capacidad de una sustancia para dañar el ADN no la convierta automáticamente en un peligro para la salud, se debe saber si la sustancia puede ser potencialmente mutagénica y/o carcinógena que genere daños a largo plazo [62, 63].

La evaluación de la genotoxicidad es uno de los requisitos fundamentales en la caracterización toxicológica de un compuesto químico. Esta evaluación puede llevarse a cabo actualmente mediante diferentes ensayos *in vitro* con cultivos celulares. Con ella, se pretende establecer una correlación entre la exposición a un determinado compuesto y la inducción de alteraciones genéticas a nivel celular para definir los efectos que pueden producir sobre la integridad genética a nivel del organismo [64]. La visualización de fragmentación de ADN celular tras la exposición a un tóxico es una señal bioquímica característica de genotoxicidad [65].

La realización del conjunto de los ensayos anteriormente mencionados permite abordar un estudio del efecto tóxico de compuestos químicos haciendo uso de

métodos de reemplazo y atendiendo al posible riesgo que generan sobre el medio ambiente y la salud humana.

2

Justificación y Objetivos



En los últimos años, se ha producido un notable aumento en el uso de productos químicos, muchos de los cuales son compuestos nuevos y mezclas cuyas propiedades fisicoquímicas, ecotoxicológicas y toxicológicas no han sido estudiadas y que pueden resultar dañinas para el medio ambiente y los seres humanos. Dentro de estos productos químicos es necesario mencionar a los disolventes, entre ellos, aquellos denominados verdes. Este tipo de disolventes se consideran menos tóxicos y peligrosos, bien por su procedencia, o por disponer de ciertas propiedades fisicoquímicas específicas que *a priori* no influyen negativamente en su toxicidad.

Tal y como se ha mencionado en el capítulo de "Introducción", existen muchos tipos de disolventes considerados como verdes. De entre todos ellos, esta tesis doctoral se centra en el estudio de los disolventes derivados de la biomasa cuya aplicación y uso han aumentado considerablemente en los últimos años. Sin embargo, no existen estudios exhaustivos realizados de manera sistemática sobre sus propiedades fisicoquímicas, ecotoxicológicas y toxicológicas que permitan concluir que realmente son disolventes verdes.

A continuación, se plantea la siguiente **hipótesis** de partida: los disolventes procedentes de la biomasa sometidos a estudio muestran propiedades adecuadas para considerarse verdes y no ser dañinos para el medio ambiente y la salud humana.

Para verificar esta hipótesis, se recopila información bibliográfica sobre dichos disolventes y se diseña una estrategia que permita obtener datos con un alto valor predictivo sobre el efecto de estos disolventes en el medio ambiente y en la salud humana.

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es realizar una valoración (eco)toxicológica de tres familias de disolventes derivados de la biomasa, relacionados estructuralmente, encaminada a conocer el impacto que generan sobre el medio ambiente y la salud humana.

Para alcanzar dicho objetivo principal es necesaria la consecución de los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Seleccionar los compuestos de interés a estudiar**. El primer paso es realizar la elección de los disolventes, para ello se escogen aquellos procedentes de la biomasa atendiendo al aumento de su uso y aplicación por su condición "verde" pero que requieren de un estudio más exhaustivo para conocer su efecto sobre el medio ambiente y la salud humana.

2. **Recopilar información bibliográfica disponible sobre las propiedades fisicoquímicas de los disolventes seleccionados**, principalmente de aquellas de interés para la (eco)toxicidad.

3. **Realizar una evaluación ecotoxicológica** determinando la toxicidad aguda provocada por los disolventes seleccionados y utilizando diferentes bioindicadores acuáticos. Estos ensayos permiten comprobar si los compuestos son perjudiciales o no, desde el punto de vista ecotoxicológico, para el medio ambiente.

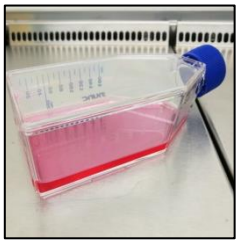
4. **Realizar una evaluación de la toxicidad de los disolventes bajo estudio,** valorando los efectos citotóxicos y neurotóxicos de los compuestos químicos seleccionados que permitan hacer un estudio inicial de su toxicidad. De este modo, se comprueba si los compuestos pueden generar daños en la salud humana.

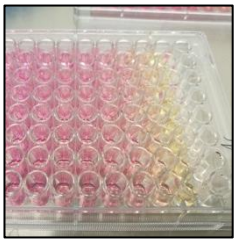
5. **Comparar los disolventes seleccionados** con disolventes tradicionales en función de los valores de ecotoxicidad y toxicidad obtenidos.

6. **Relacionar las propiedades fisicoquímicas con la ecotoxicidad y toxicidad** de los disolventes.

3

Material y Métodos





En este capítulo se exponen los materiales y equipos utilizados así como la metodología llevada a cabo durante este trabajo. Todo ello permitió alcanzar los diferentes objetivos marcados.

A continuación, se presenta un esquema relacionado con la metodología del trabajo realizado en esta tesis doctoral en la figura 3.1.

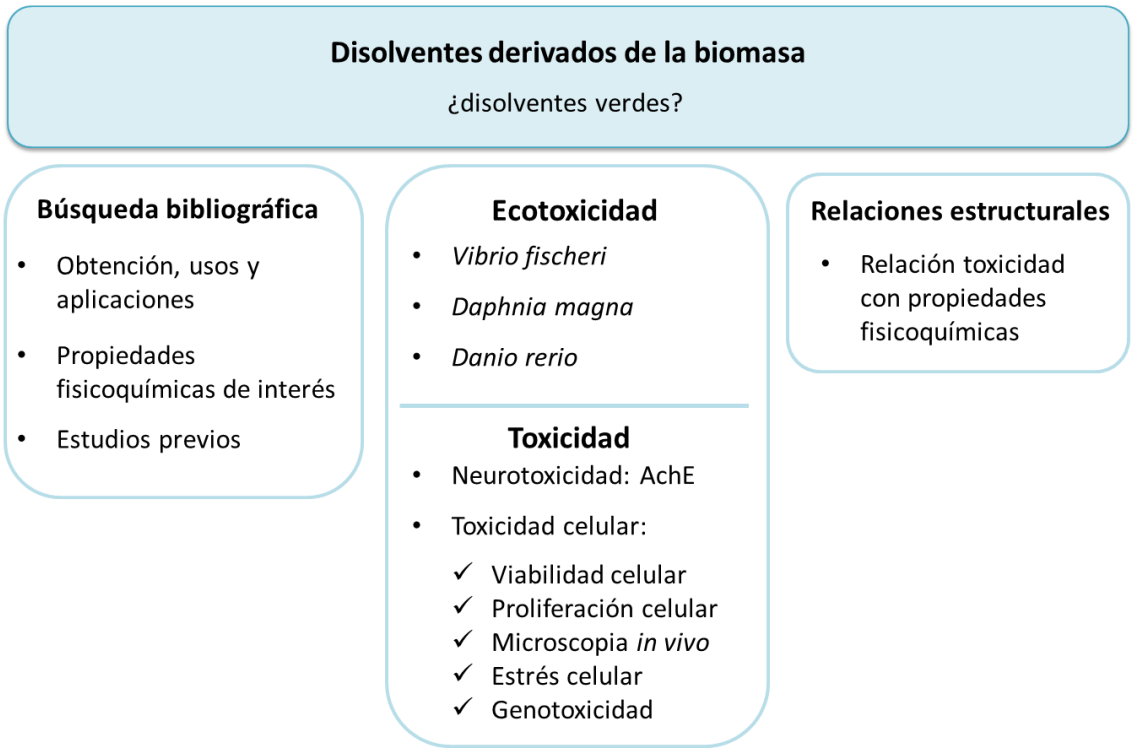


Figura 3.1. Esquema de la metodología seguida en esta tesis doctoral.

1. SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE ESTUDIO

El primer paso fue la selección de los compuestos de interés a estudiar, centrándose ésta en aquellos disolventes que la *Green Chemistry* clasifica como disolventes verdes. Esta corriente científica considera a cuatro grandes grupos de compuestos como disolventes verdes: los disolventes fluorados, los líquidos iónicos, los fluidos supercríticos y los disolventes derivados de la biomasa [2, 10].

De estos grupos mencionados, se seleccionaron los disolventes derivados de la biomasa debido al auge y al incremento del número de publicaciones científicas relacionadas con estos disolventes. En este grupo de disolventes se incluyen un alto número de familias como son los glicoles, levulinatos, furanos, lactatos, terpenos, acrilatos, derivados del furfural o ésteres de ácidos grasos [66].

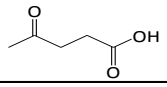
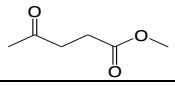
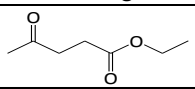
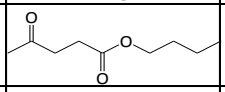
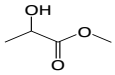
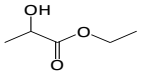
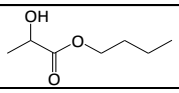
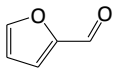
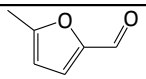
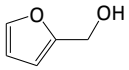
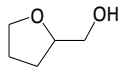
Para la selección final de los disolventes a estudiar, la búsqueda bibliográfica y selección se centró en el cumplimiento de las características propias de un disolvente verde. Estas características son [10, 67]:

- Baja presión de vapor
- Elevado punto de ebullición
- Biodegradabilidad
- Bajo coste
- Capacidad de disolver compuestos químicos: polaridad
- Procedencia de recursos renovables
- Ausencia de bioacumulación
- Necesidad de ser reciclado
- Ausencia de toxicidad del disolvente y sus productos de degradación

El cumplimiento *a priori* de las propiedades anteriormente mencionadas fue requisito de selección de los disolventes a estudiar. Además, se buscaron ciertas similitudes estructurales entre los compuestos seleccionados.

En base a esto, se seleccionaron once compuestos cuya información sobre la estructura, fórmula molecular, peso molecular, pureza y procedencia se detalla en la tabla 3.1. Tras la selección de los disolventes, esta información se completó con una búsqueda bibliográfica que permitió conocer las principales características de los compuestos: obtención, usos y aplicaciones.

Tabla 3.1. Información sobre los compuestos bajo estudio.

Compuesto	Estructura	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Pureza	Procedencia
Ácido levulínico		$C_5H_8O_3$	116,12	98%	Sigma-Aldrich
Levulinato de metilo		$C_6H_{10}O_3$	130,14	98%	Sigma-Aldrich
Levulinato de etilo		$C_7H_{12}O_3$	144,17	99%	Sigma-Aldrich
Levulinato de butilo		$C_9H_{16}O_3$	172,22	98%	Sigma-Aldrich
Lactato de metilo		$C_4H_8O_3$	104,10	98%	TCI
Lactato de etilo		$C_5H_{10}O_3$	118,13	98%	Sigma-Aldrich
Lactato de butilo		$C_7H_{14}O_3$	146,19	98%	Sigma-Aldrich
Furfural		$C_5H_4O_2$	96,09	99%	Sigma-Aldrich
5-metilfurfural		$C_6H_6O_2$	110,11	99%	Sigma-Aldrich
Alcohol furfurílico		$C_5H_6O_2$	98,10	99%	Sigma-Aldrich
Alcohol tetrahidrofurfurílico		$C_5H_{10}O_2$	102,13	99%	Sigma-Aldrich

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos seleccionados utilizando diferentes bases de datos como la Web Of Science, Scopus, Pubmed o Worldcat.

Las propiedades fisicoquímicas en las que se centró la búsqueda fueron:

- Solubilidad de los compuestos en agua (*s*)

- Concentración de agregación crítica (*c.a.c.*)
- Densidad (ρ)
- Coeficiente de reparto (*log P*)
- Punto de ebullición (T_{eb})

Estas propiedades son de interés para la caracterización intrínseca de los compuestos así como para el estudio de ecotoxicidad y toxicidad a realizar posteriormente. Dado que muchos compuestos químicos se liberan al medio ambiente y, más concretamente a través de aguas residuales industriales, muchas de estas propiedades están relacionadas con el medio acuoso. Es por ello que estas propiedades ofrecen información valiosa del comportamiento de los compuestos y su biodisponibilidad, una vez incorporados al medio ambiente acuático. De este modo, se amplió el conocimiento de los productos y permitió dar a conocer cómo se comportan en determinadas condiciones en las que se puedan encontrar en el medio. Además, estas propiedades también permiten estimar cómo se comportarán los compuestos en los diferentes organismos de modo que se pueda extrapolar información al posible efecto que generen en la salud humana.

3. ESTUDIO DE LA ECOTOXICIDAD

La ecotoxicología es la ciencia que permite conocer los efectos de las sustancias químicas sobre las estructuras y función de los ecosistemas. Este trabajo se centró en la realización de ensayos de toxicidad aguda utilizando organismos del medio ambiente acuático, principal destino esperado una vez utilizados los disolventes. Previamente a la selección de bioensayos a realizar, se realizó una búsqueda bibliográfica de la información previa existente sobre datos de ecotoxicidad de cada disolvente y se detectó ausencia de datos importantes de ecotoxicidad, por lo que se consideró relevante completarla.

Para la evaluación de la ecotoxicidad aguda de los disolventes bajo estudio, se seleccionaron diferentes ensayos para la medida experimental en diversos organismos acuáticos haciendo uso de protocolos estandarizados:

- Ensayo de inhibición de la luminiscencia emitida por la bacteria *V. fischeri*
- Ensayo de movilidad del crustáceo *D. magna*
- Ensayo de determinación de letalidad y efectos subletales en embriones de pez *D. rerio*

Al realizar estos bioensayos, se estudió la relación entre la concentración del compuesto químico a la cual se expuso cada organismo y el consecuente efecto nocivo que produjo. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del riesgo para el medio ambiente generado por la presencia de sustancias químicas [33] y permitió la obtención de los valores de EC_{50} o LC_{50} en los organismos expuestos a los diferentes compuestos [34].

En todos los bioensayos se llevaron a cabo dos etapas principales:

1. Ensayo preliminar. Este ensayo permitió obtener una aproximación de las concentraciones responsables del efecto a observar en el 100% de los organismos expuestos al tóxico y en ninguno de los organismos para cada uno de los compuestos. Con estos resultados se determinaron los límites de concentraciones para el ensayo final.

2. Ensayo final: se llevó a cabo el ensayo con diferentes concentraciones de la sustancia a evaluar, estableciéndose una progresión geométrica entre la mayor concentración que no haya causado mortalidad y la menor concentración que haya generado mortalidad total en el ensayo preliminar. Así, se determinaron las concentraciones que causan efecto entre el 10% y el 90% y que proporcionaron el resultado final, consiguiendo obtener el valor de EC_{50} o LC_{50} para cada sustancia.

A continuación se detalla la metodología experimental seguida para cada uno de los tres bioensayos realizados en esta tesis doctoral.

3.1 Ensayo de V. fischeri: medida de la inhibición de bioluminiscencia

La realización de este bioensayo se basó en el procedimiento establecido en la norma UNE-EN-ISO 11348-3 "Calidad del agua. Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la bacteria de *Vibrio fischeri*" [68].

El bioensayo permite medir las concentraciones de diferentes compuestos que provocan disminución de la luminiscencia emitida en condiciones normales por la bacteria *V. fischeri*, valorando de esta manera la toxicidad aguda. Cuando la sustancia no tiene efectos tóxicos tras 30 minutos de incubación con las bacterias, no se observa ninguna modificación en la intensidad de la luz emitida por las fotobacterias. Cuando la muestra presenta efectos tóxicos tras una incubación de 30 minutos, la emisión de luz de las fotobacterias disminuye. Esta disminución en la intensidad de luz emitida por las bacterias es, por tanto, proporcional a la toxicidad del compuesto o a la concentración de agentes tóxicos.

Se trata de un bioensayo rápido y económico por lo que es altamente utilizado. Además, presenta buenas características tales como la sensibilidad, poder discriminatorio, reproducibilidad y fácil aplicación para contaminantes orgánicos e inorgánicos [45]. En cambio, la medida de toxicidad aguda en este bioindicador puede tener algunos inconvenientes por la existencia de interferencias en la muestra que afecte al resultado final. Esto ocurre en las siguientes situaciones cuando:

- Las sustancias a medir sean insolubles, poco solubles, volátiles o que reaccionen con el NaCl presente en el medio de ensayo.
- Las disoluciones o aguas de medida contengan coloración o turbidez que impida la medición adecuada de luminiscencia.
- Las concentraciones de sal en la muestra sean mayores de 20000 mg/L en NaCl o su osmolaridad produzca efectos hiperosmóticos.

Los ensayos de medidas de bioluminiscencia de los compuestos a estudiar, se realizaron a partir de bacterias liofilizadas *V. fischeri* (NRRL B-11177) de Macherey-

Nagel. Estas bacterias se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso. Para los ensayos, se utilizaron kits comercialmente conocidos como BioFix®Lumi "Multi-shot" para 200 determinaciones, de la misma marca comercial, que disponen de la solución reconstituyente y las bacterias. Estos kits incluyen un certificado de calidad en conformidad con la UNE-EN-ISO 11348-3.

El espectrofotómetro o luminómetro empleado para la medida de la bioluminiscencia emitida por las bacterias fue Biofix®Lumi-10 (Macherey-Nagel) con detector "Ultra Fast Single Photon Counter" (Contador Ultra Rápido de Fotones) en un rango espectral de 380 a 630 nm. La señal detectada se registró como porcentaje de inhibición (I%) o efecto inhibidor tras 30 minutos de exposición de las muestras con las bacterias.

Todas las muestras fueron realizadas en disolución acuosa al 2% de NaCl. Se prepararon disoluciones con factor de dilución de ½, el cual permitió cubrir un amplio intervalo de dilución y se partió siempre de, al menos, 2 disoluciones madre obteniendo así un número mayor de concentraciones de ensayo.

El control del pH en las muestras a ensayar es altamente importante ya que han de encontrarse en un rango específico entre 6 y 8,5 por ser el óptimo para la viabilidad de *V. fischeri*. Por tanto, se midió el pH de todas las disoluciones realizadas utilizando el pHmetro Crison Basic20. Para aquellas muestras que lo necesitaron, se ajustó el pH añadiendo ácido clorhídrico (0,1 o 1 N) o hidróxido sódico (0,1 o 1 N). En todos los ensayos, se utilizaron controles negativos y positivos (fenol: 42,5 mg/L y sulfato de zinc 2,2 mg/L) [68, 69].

Para comenzar el ensayo se siguieron las indicaciones de reconstitución de las bacterias proporcionadas en el kit comercial. Esta solución con bacterias se mantuvo atemperada a 4°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 500 µL de la suspensión bacteriana en varias cubetas que se colocaron en el interior de un baño termostático (Selecta) que los mantuvo a 15°C ± 1°C durante 10 minutos. El control de la temperatura durante la ejecución del ensayo es fundamental por su implicación sobre la emisión natural de luz [70].

Transcurridos los 10 minutos, se realizó una medida de intensidad de luz inicial de las bacterias en cada cubeta de ensayo en el luminómetro. Posteriormente, se añadieron 500 µL de las disoluciones a testar a la solución de bacterias de cada cubeta. Tras 30 minutos de exposición de las muestras a las bacterias, se determinó la medida final de intensidad de luz. Durante todo este tiempo, la temperatura de las cubetas se mantuvo constante. El equipo proporcionó el valor del porcentaje de inhibición de la actividad bioluminiscente tras ese periodo de exposición con la muestra correspondiente. Para la obtención de la toxicidad aguda en este bioensayo se empleó el método "BioTox-B" del luminómetro. En la figura 3.2 se puede observar un esquema del procedimiento que se llevó a cabo para este ensayo.

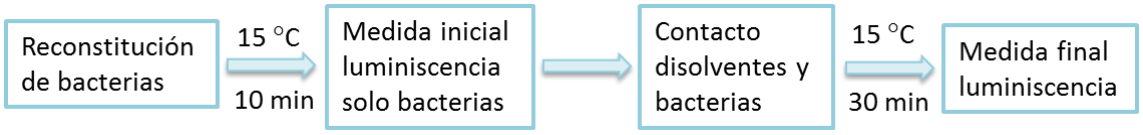


Figura 3.2. Esquema del procedimiento realizado para la medida de bioluminiscencia con el organismo acuático V. fischeri.

A través de los diferentes datos de inhibición de la luminiscencia, se calculó la concentración efectiva de tóxico que produce la reducción del 50% (EC_{50}) de la actividad bioluminiscente de la bacteria *V. fischeri.* Los valores de EC_{50} se obtuvieron a través de la función gamma Γ, es decir, la relación entre la intensidad de la luz perdida por la solución bacteriana y la que quedó tras la exposición, tal y como se muestra en la siguiente ecuación 1:

$$\Gamma = \frac{H_t}{100 - H_t} \qquad (1)$$

donde H_t es el porcentaje de inhibición.

A partir de los valores de gamma, se puede deducir una relación lineal entre la función Γ y la concentración de cada compuesto ensayada, tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\log \Gamma = \log a + \log C \qquad (2)$$

Los valores de EC_{50} (aquellos que generen la reducción del 50% de la bioluminiscencia) se calcularon para cada sustancia a partir de la regresión lineal de la ecuación 2.

3.2 Ensayo de D. magna: test de inmovilización aguda

El método que se llevó a cabo en este bioensayo está basado en la norma OCDE 202, adaptada el 4 de Abril de 1984 [71], "*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test". *D. magna* es un organismo muy importante en los estudios de ecotoxicología acuática debido a que es muy sensible a la contaminación de las aguas [49] haciendo que la presencia de compuestos químicos altere su comportamiento [48].

Este bioensayo permite determinar la inmovilización de daphnias neonatas, de menos de 24 horas de vida, expuestas a diferentes concentraciones de un tóxico. Los ensayos se realizaron a partir de efipias (huevos de *D. magna*) suministradas por la casa comercial *Ecotest* y conservadas a 4°C antes de ser utilizadas.

Las efipias requieren de un medio específico compuesto por $NaHCO_3$ a una concentración de 67,75 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 294 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 123,25 mg/L y KCl a 5,75 mg/L. El medio se aireó durante una hora antes de su uso y, tras transferir las efipias a una placa Petri, se añadió el medio. Estas placas se introdujeron en un incubador Toxkit (modelo CH-0120D-AC/DC) durante 72 horas a 20-22°C con 6000 lux, condiciones que favorecen la eclosión de los huevos. Este medio se renovó cada 24 horas.

Transcurridas aproximadamente 72 horas, los huevos comenzaron a eclosionar. En este momento se realizaron las disoluciones de los disolventes a testar, utilizando siempre el mismo medio de cultivo que el usado para el mantenimiento de las efipias. Se prepararon varias disoluciones madre y disoluciones a partir de las madre, con factor de dilución de ½. También se preparó una disolución de control positivo con $K_2Cr_2O_7$ con una concentración de 0,6-2,1 mg/L [71].

Una vez preparadas las disoluciones, se alimentó a los neonatos con espirulina (Ecotest) y se dejó reposar durante 2 horas. Trascurrido este tiempo, se llevó a cabo el contacto de los neonatos con cada concentración de compuesto en una placa de pocillos. Cada concentración, control negativo y control positivo se colocó en cuatro pocillos diferentes con 10 mL de la disolución correspondiente y 5 neonatos, por lo que, cada concentración se ensayó con un total de 20 neonatos.

Finalizado el trasvase de los neonatos a los pocillos correspondientes, se tapó la placa con parafilm e incubó a una temperatura de 20-22°C durante 24 horas en completa oscuridad. Pasado este tiempo, se cuantificó el número de daphnias inmovilizadas en cada pocillo. Se consideró inmovilización cuando los neonatos no se movieron durante 15 segundos, ya que la movilidad del organismo sano es muy alta. En la figura 3.3 se representa un esquema del procedimiento que se realizó para este ensayo.

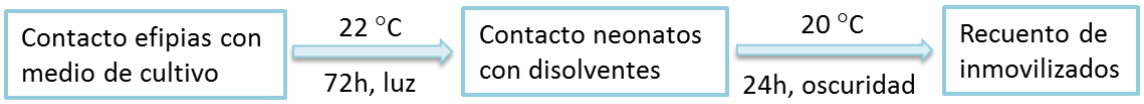


Figura 3.3. Esquema del procedimiento realizado para la medida de inmovilización de neonatos de D. magna.

Como resultado del ensayo, se determinó la concentración de la muestra que produce la inmovilización del 50% de la población de neonatos expuestos.

3.3 Ensayo de *D. rerio*: test de letalidad en embriones de peces

El desarrollo de este bioensayo corresponde a una adaptación del Fish Embryo Toxicity Test (FET) basado en la norma OECD 203 "Test de toxicidad aguda con embriones de pez" aprobada en el año 2013 [72]. El ensayo se realizó en ZF Biolabs.

El uso de este ensayo se ha extendido en los últimos años para la valoración de los peligros y el riesgo ambiental. Se trata del ensayo usado con mayor frecuencia para medir la ecotoxicidad en vertebrados [26-28]. Asimismo, la toxicidad aguda en embriones de pez se ha demostrado que correlaciona bien con la toxicidad en peces

adultos [28]. Este ensayo permite evaluar la toxicidad aguda de sustancias químicas presentes en agua obteniendo resultados de letalidad e, incluso, conocer efectos subletales en embriones que han sobrevivido a la exposición. Además, los embriones de pez cebra (hasta 5 días post fertilización) no se encuentran protegidos de acuerdo a la legislación Europea (Directiva 2010/63/EU).

El bioensayo se basa en la observación y recuento (ausencia o presencia) de determinados parámetros morfológicos y funcionales considerados como criterios de letalidad (*endpoints*) en los embriones de pez cebra. Los embriones se expusieron a los compuestos a estudiar y las observaciones del estado de los mismos se realizaron a las 24 y 48 horas después del comienzo de la exposición (horas post-exposición: hpe).

Los indicadores de letalidad que se observan son la coagulación del embrión, la ausencia de formación de somitas, cola no separada y ausencia de latido cardiaco (este último indicado sólo es observable a las 48 horas post-fecundación: hpf). En la figura 3.4 se muestran las imágenes de embriones sanos de pez cebra a las 24 y 48 hpf y también imágenes representativas de embriones con indicadores específicos de letalidad que se pueden encontrar en la realización de este ensayo.



Figura 3.4. Imágenes representativas de embriones de D. rerio sanos a 24 y 48 hpf e imágenes de embriones con criterios de letalidad. Imágenes cedidas por ZFBiolabs.

Las distintas disoluciones de los compuestos a estudiar se realizaron en agua con un 0,25% de dimetilsulfóxido (DMSO), de esta manera se consigue aumentar la permeabilidad del corion del embrión. Del mismo modo, se realizaron las disoluciones de los controles positivo (4155 mg/L de 4-acetamidofeno o paracetamol) y negativo (agua con 0,25% de DMSO).

En el ensayo se utilizaron embriones obtenidos mediante inducción hormonal de los reproductores. La obtención de los embriones se llevó a cabo mediante fecundación *in vitro*, realizándose posteriormente un control de calidad a las 2 hpf (ver figura 3.4) y seleccionándose sólo puestas con un porcentaje de viabilidad superior al 80%.

Inmediatamente después, los embriones se pusieron en contacto con cada una de las concentraciones de los compuestos a ensayar. Para ello, en una placa de 96 pocillos con fondo en U se vertieron 50 µL/pocillo de cada concentración y se mantuvieron a una temperatura de 24-26°C, con una saturación de oxígeno en el agua entre el 60-100% y a un pH entre 6,5-8,5, ajustándose el mismo en caso de ser necesario. Se expuso a los embriones a 8 concentraciones seriadas de cada compuesto con un factor de dilución de 2 (12 embriones por concentración) y se realizó por duplicado. A las 24 horas, se hizo un recambio del 75% del volumen de cada disolución en cada uno de los pocillos.

A las 24 hpe se realizó una primera lectura basándonos en la lectura de tres *endpoints* (coagulación del huevo, ausencia de somitas y no separación de la cola). Esta lectura tiene como objetivo fundamental comprobar el correcto desarrollo del ensayo.

Transcurridas 48 hpe se hizo la lectura de letalidad de los embriones basándonos en los cuatro *endpoints* (los tres mencionados a las 24 hpe más la ausencia de latido). Con esta lectura, se obtuvieron los datos de letalidad en función de la concentración expuesta.

Finalmente, se llevó a cabo la estimación de la LC_{50} de cada uno de los compuestos para el 50% de los embriones a las 48 hpe. Como resultado del ensayo, se

determinó la concentración de la muestra que produce la letalidad del 50% de la población de embriones expuestos.

Este ensayo permite también visualizar diferentes efectos subletales en los embriones tras la exposición a tóxicos. Los más característicos son: una baja pigmentación, desarrollo embrionario retrasado, circulación sanguínea débil o malformaciones. Estos efectos pueden relacionarse con señales de teratogenicidad y solo se observaron en aquellos casos en los que los embriones se encontraron vivos.

3.4 Determinación de la concentración efectiva media y análisis estadístico

Los valores se expresaron como la media ± el error estándar de la media (EEM). Los valores de EC_{50} o LC_{50} y sus errores fueron obtenidos por regresión lineal (ecuación 2) en el caso de *V. fischeri* y por regresión no lineal para *D. magna* y *D. rerio*.

Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.

3.5 Clasificación de toxicidad acuática de los disolventes

Se realizó una clasificación de todos los disolventes estudiados siguiendo el modelo de Passino y Smith [73] en función de rangos de toxicidad que se describen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Clasificación de Passino y Smith para bioindicadores acuáticos.

LC_{50} o EC_{50} (mg/L)	**Descriptor de toxicidad**
< 0,1	Extremadamente tóxico
0,1 - 1,0	Altamente tóxico
1 – 10	Moderadamente tóxico
10 – 100	Ligeramente tóxico
100 – 1000	Prácticamente inofensivo
> 1000	Relativamente inofensivo

Esta clasificación está internacionalmente aceptada y clasifica los compuestos químicos en diferentes categorías de toxicidad en función de la EC_{50} o LC_{50} obtenida para un determinado organismo acuático. Para clasificar los disolventes se utilizaron los valores de EC_{50} o LC_{50} obtenidos experimentalmente en los ensayos de *V. fischeri, D. magna* y *D. rerio.*

4. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

La toxicología es la ciencia encargada de la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones que pueden tener un efecto sobre la salud humana.

Esta tesis doctoral se centró en estudiar el posible efecto neurotóxico generado por el propio disolvente, así como la valoración del efecto de los compuestos sobre líneas celulares sanas y tumorales a través de la realización de los siguientes ensayos:

- Evaluación del perfil neurotóxico: ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).
- Evaluación de la toxicidad celular:
  - ✓ Análisis de la viabilidad celular: ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).
  - ✓ Estudio de proliferación celular: ensayo de Bradford.
  - ✓ Estudio de la morfología celular
    - Microscopía óptica de contraste de fase: Análisis morfológico *in vivo*
    - Microscopía de fluorescencia: Visualización de lípidos
  - ✓ Análisis de la genotoxicidad: visualización de la fragmentación de ADN celular.

A continuación, se detallan la metodología y los materiales y equipamiento utilizados para la realización de cada uno de los ensayos.

4.1 Evaluación del perfil neurotóxico: Ensayo de la medida de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) forma parte del grupo de enzimas colinesterasas y está presente en la mayoría de animales. Esta enzima es responsable de la degradación electrolítica del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en los productos inactivos colina y ácido acético. Habitualmente, se encuentra en tejido nervioso, glóbulos rojos y tejido muscular [74].

La AChE es una de las enzimas más importantes en los seres vivos a nivel nervioso. Se encuentra en la terminación postsináptica, hidrolizando rápidamente a la acetilcolina, lo que conlleva la repolarización de la membrana o de la placa basal (en las conexiones neuromusculares) y las prepara para la llegada de un nuevo impulso eléctrico. Por tanto, la función normal de la acetilcolina depende de su rápida hidrólisis por la acetilcolinesterasa, que permite la brevedad y unidad de los impulsos propagados sincrónicamente [24]. La inhibición de esta enzima provoca acumulación de la acetilcolina en la unión sináptica y la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos por lo que conlleva efectos adversos en los procesos neuronales [75].

Los receptores a los que se une esta enzima son colinérgicos, muscarínicos o nicotínicos. Algunos de los efectos en la salud humana asociados a la inhibición de esta enzima son debidos a la estimulación de estos receptores:

- Una estimulación continuada de receptores muscarínicos genera broncoconstricción, mayor secreción, salivación y lagrimeo, aumenta el tono gastrointestinal y peristaltismo (náuseas, vómitos, diarreas, bradicardia)
- Una estimulación continua de receptores nicotínicos provoca debilidad muscular, tics involuntarios, calambres, insomnio, jaquecas, depresión del centro respiratorio, etc.

La medida de inhibición de esta enzima al contacto con los disolventes estudiados nos permitió conocer el posible riesgo potencial a nivel del sistema nervioso. No obstante, es necesario destacar que una inhibición de la enzima no implica que pueda generar un efecto a nivel de todo el organismo.

El protocolo que se siguió para la medida de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa está basado en el método de Ellman [76]. Se trata de un método espectrofotométrico en el que un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), reacciona con el grupo sulfhidrilo de la tiocolina liberado tras la hidrólisis del sustrato, acetiltiocolina (ATCI) por la acción de la enzima colinesterasa. El resultado de esta reacción es un compuesto coloreado amarillo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, susceptible de ser medido espectrofotométricamente a la longitud de onda de 405 nm. La inhibición de la enzima provoca una disminución del color amarillo [77].

El esquema general de la reacción que se lleva a cabo en el desarrollo de este método, se presenta en la Figura 3.5.

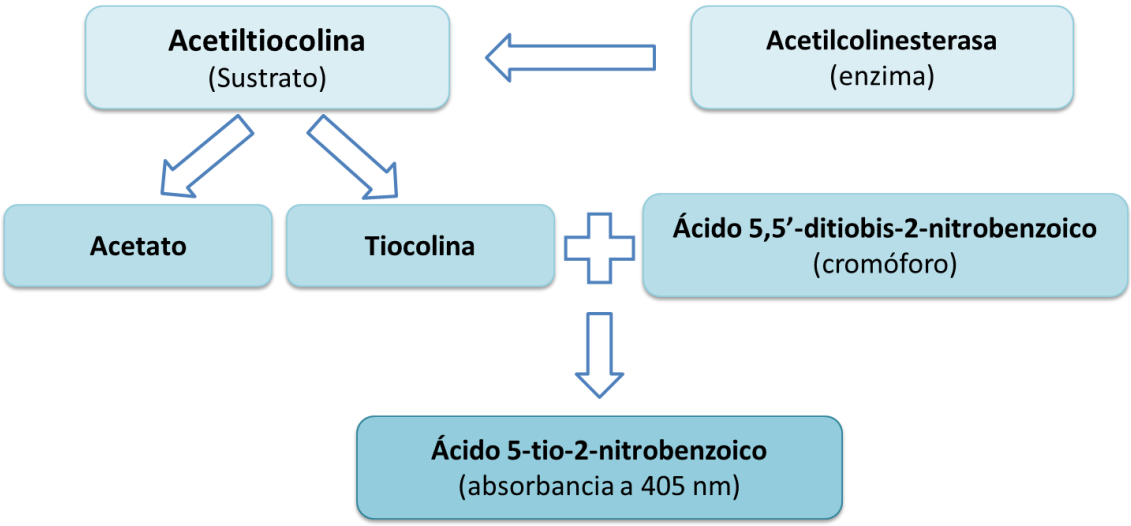


Figura 3.5. Fundamento de la reacción llevada a cabo en la determinación de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por el método Ellman.

Para la realización de este ensayo se emplearon los siguientes reactivos: enzima acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (tipo VI-S500A), albúmina de suero bovina (BSA), Tris-HCl, yoduro de acetiltiocolina y DTNB (reactivo de Ellman), todos obtenidos de Sigma-Aldrich. El control positivo que se utilizó fue la fisostigmina,

también llamada eserina (Cymit Química), debido a su conocida actividad colinérgica y tóxico para este proceso.

En este ensayo se utilizaron también tres tampones:

- Tampón A: 50 mM tris-HCl (pH=8)
- Tampón B: 50 mM tris-HCl (pH=8) + 0,1% BSA
- Tampón C: 50 mM tris-HCl (pH=8), 0,1 M NaCl, 0,02 M $MgCl_2$ $6H_2O$

Se preparó una disolución madre de cada compuesto a testar disuelto en el tampón A. A partir de esta disolución madre se realizaron diluciones seriadas en el mismo tampón hasta obtener 6 disoluciones de concentraciones diferentes. Del mismo modo, se prepararon diferentes disoluciones del control positivo.

La actividad inhibidora de cada uno de los compuestos bajo estudio fue medida utilizando una microplaca de 96 pocillos. Cada pocillo contuvo 25 µL de disolución 15 mM de ATCI en agua Millipore como sustrato de la reacción, 125 µL de disolución 3 mM de DTNB disuelto en el tampón C, 50 µL tampón B y 25 µL de cada una de las concentraciones de compuesto a ensayar. Además, se emplearon blancos de reacción y control positivo.

Una vez añadidos 25 µL de la enzima (0.22 U/mL), la absorbancia se midió a 405 nm durante 6 minutos en ciclos de 30 segundos. Para ello se utilizó un lector de microplacas (BMG-LabTech SpectroStar Nano).

A través de los diferentes datos, se calculó la concentración efectiva de tóxico que produce la inhibición del 50% (IC_{50}) de la actividad enzimática de la AChE. Para ello, se obtuvo la pendiente de la recta de los valores de absorbancia para cada concentración de compuesto y se calculó el % de inhibición correspondiente a cada concentración con la siguiente ecuación:

$$I_{C_x}\% = \left(1 - \frac{pendiente\ C_X}{pendiente\ control}\right) \times 100 \qquad (3)$$

Con la relación lineal establecida entre cada concentración y su valor de inhibición, se interpoló para obtener el valor de $IC_{50.}$ Cada compuesto se testó, al menos, tres veces en ensayos independientes.

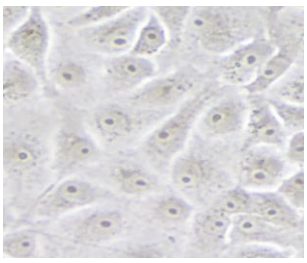
4.2 Cultivos celulares

Para la realización de esta parte de trabajo se utilizaron tanto líneas celulares sanas como tumorales.

4.2.1 Líneas celulares seleccionadas

A continuación se describen las diferentes líneas celulares utilizadas:

- La **línea celular Cos-7** proviene de fibroblastos derivados de riñón de primate *Afrikan green* siendo de gran similitud a los fibroblastos de riñón humano. Disponen de una morfología fibroblástica elongada aplanada y triangular cuando se encuentran aisladas pero con cierta tendencia esférica cuando se adhieren a otras células formando una malla fibroblástica y generando un bordeado ligero cóncavo [78]. Estas células se han mantenido en el medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 2 mM de L-Glutamina (Gibco), antibiótico penicilina-G/estreptomicina al 1% (Gibco) y suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%. En la figura 3.6 se presenta información sobre el origen, tipo, código de la línea celular y una imagen representativa de las células en cultivo.



ATCC® CRL1651™

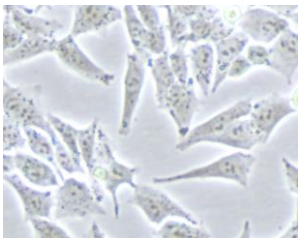
Organismo: *Cercopithecus aethiops*

Tipo celular: fibroblasto adherente

Origen: riñón – no tumoral

Figura 3.6. Información sobre la línea celular Cos-7.

- Las **células A375** son una línea celular que proviene de queratinocitos humanos de melanoma. Estas células presentan una morfología epitelial poligonal plana, con un crecimiento rápido en monocapa y tendencia a crecimiento en colonias agrupadas [79]. Estas células se han mantenido en el medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con antibiótico penicilina-G/estreptomicina al 1% (Gibco) y suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%. La morfología de estas células en cultivo, así como su procedencia, se puede observar en la figura 3.7.



ATCC® CRL-1619™

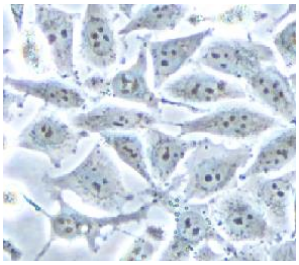
Organismo: *Homo sapiens*

Tipo celular: queratinocito adherente

Origen: epitelio – tumoral

Figura 3.7. Información sobre la línea celular A375.

- La **línea celular HaCaT** se trata de queratinocitos de humanos adultos. Estas células tienen una morfología alargada cuando se encuentran aisladas, no obstante, tienden a crecer agrupadas en monocapas homogéneas con una morfología poligonal [79]. Estas células se han mantenido en el medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con antibiótico penicilina-G/estreptomicina al 1% (Gibco) y suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 10%. En la figura 3.8 se muestra una imagen de las células en cultivo en condiciones basales e información característica sobre las células HaCaT.



ATCC® PCS-200-011™

Organismo: *Homo sapiens*

Tipo celular: queratinocito adherente

Origen: epitelio – no tumoral

Figura 3.8. Información sobre la línea celular HaCaT.

4.2.2 Descongelación de células

Los cultivos celulares se pusieron en funcionamiento a partir de cultivos congelados en DMSO. Para la descongelación se trasvasó el cultivo celular a 10 mL del medio correspondiente. Se centrifugó durante 7 minutos a 1200 rpm y temperatura ambiente en la centrífuga (Heraeus Biofuge R). Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo.

En este momento, se observó en el microscopio (Nikon Eclipse E200) la viabilidad del cultivo utilizando azul trypan y una cámara Neubauer (coloración de las células no viables al tomar el colorante por aumento de permeabilidad de su membrana). El cultivo celular obtenido se añadió a un frasco de cultivo y se adicionó el medio de cultivo correspondiente introduciéndolo posteriormente en el incubador a 37°C y 5% CO_2.

4.2.3 Mantenimiento de los cultivos celulares

Todas las células fueron mantenidas en frascos de cultivo en un incubador (Sanyo MCO-18AC) que proveía de una atmósfera humidificada a 37°C de temperatura con un aporte del 5% de CO_2. El medio de cultivo correspondiente a cada línea celular se cambió cada 2 o 3 días o siempre que fue necesario. El cultivo celular se mantuvo en el frasco de cultivo hasta alcanzar confluencia de crecimiento en torno al 80-90%, momento en el cual, se utilizaron las células para los diferentes ensayos o para expandir el cultivo.

4.3 Estudio de la toxicidad celular

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. En esta tesis doctoral se desarrollaron una serie de pruebas *in vitro* para predecir el efecto tóxico de los disolventes utilizando como modelos experimentales los cultivos celulares primarios anteriormente mencionados.

Para ello, se utilizaron los cultivos celulares cuando el nivel de confluencia era del 80%. Las células se despegaron de la superficie de cultivo empleando tripsina-EDTA (ácido etilendiaminoacético, 200 mg/L) a 0,25% (v/v). Para cada ensayo se realizaron siembras exactas en diferentes superficies de cultivo, en función del desarrollo experimental a seguir y en dependencia del número de células a sembrar. Una vez dispuestas, se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C y un 5% de CO_2 durante, al menos, 24 horas para su adherencia.

4.3.1 Ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) para la medida de efecto citotóxico.

Para el análisis de la viabilidad celular por contacto con una sustancia, se siguió el método colorimétrico analítico-cuantitativo descrito por Mosmann en 1983 [80]. Este método se basa en la medida del daño inducido al contacto por un tóxico estudiado en el metabolismo de glúcidos mediante la evaluación de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales. En una célula viable, el reactivo coloreado amarillo (sales sódicas de tetrazolium, MTT) es reducido por deshidrogenasas a un compuesto insoluble (formazan) formando cristales de color púrpura en la célula [80, 81], tal y como se muestra en la figura 3.9.

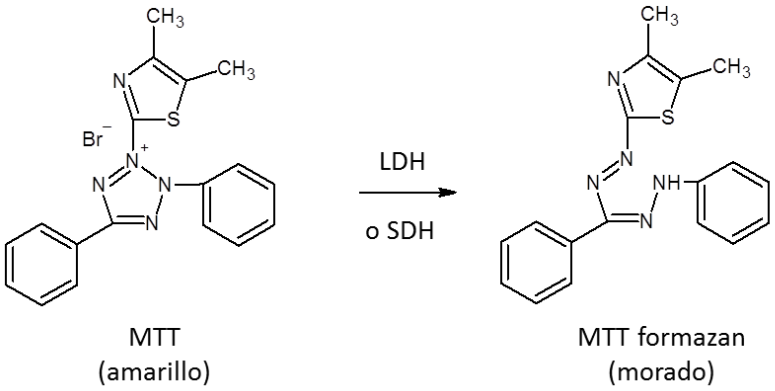


Figura 3.9. Reacción de reducción de MTT a formazan por enzimas deshidrogenasas.

El hecho de que las células puedan metabolizar este compuesto da una idea de la integridad mitocondrial. La cantidad de formazan obtenida es directamente proporcional a la cantidad de células viables. Este compuesto coloreado final puede ser cuantificado espectrofotométricamente [82].

Alcanzado el nivel de confluencia del 80% en los cultivos celulares, se dispensaron en una placa de 96 pocillos: 200000 células/mL para la línea Cos-7, 120000 células/mL para A375 y 100000 células/mL para HaCaT en un volumen final de 100 µL del medio de cultivo correspondiente por pocillo y se incubaron al menos durante 24 horas para su adherencia

Una vez se alcanzó el tiempo de adherencia, se eliminó el medio de cada pocillo y se sustituyó por las disoluciones a testar. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los bioensayos de ecotoxicidad, y más concretamente para el vertebrado *D. rerio*, se determinó un rango de concentraciones de interés toxicológico para los ensayos. Se llevó a cabo el ensayo final con siete concentraciones diferentes (entre 5 y 2000 mg/L) de la sustancia a testar para la obtención de su efecto toxicológico. Las disoluciones a diferentes concentraciones se prepararon partiendo de una disolución madre de mayor concentración y realizando diluciones seriadas, siempre en el medio de cultivo adecuado para cada línea celular y sin añadirle SFB. Además, se prepararon un control positivo (disolución 1:1 de DMSO en medio de cultivo sin SFB), un control negativo (medio de cultivo sin SFB) y un blanco (medio de cultivo sin SFB añadido en pocillos que no tienen células adheridas). Una vez se pusieron en contacto las diferentes disoluciones con las células, las placas se incubaron durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo de incubación se eliminó el contenido de cada pocillo, se añadieron 100 µL de la disolución de MTT preparada y se incubaron durante 4 horas a 37°C, 5% CO_2. Esta disolución se preparó disolviendo 3-(4,5dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) a 5000 mg/L en tampón fosfato salino (PBS) estéril y se diluyó 10 veces en medio de cultivo sin SFB. Pasadas las 4 horas, se eliminó la mezcla de reacción por inversión de cada placa de ensayo y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazan generados. Tras una agitación de 5 minutos, se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 550 nm en el lector de microplacas (BioTek Sinergy H1)

A partir de los valores de absorbancia, se obtuvieron valores de porcentaje de viabilidad celular para cada línea celular testada con cada disolvente a diferentes

concentraciones. Cada compuesto se testó, al menos, tres veces en ensayos independientes.

4.3.2 Estudio de proliferación celular: ensayo de Bradford

Cuando los cultivos celulares están en contacto con sustancias tóxicas, las diferentes estructuras de la matriz celular dejan de ser estables ocasionando la muerte celular. Estas células muertas se desprenden y flotan en el cultivo, de manera que pueden ser eliminadas con facilidad. Si se cuantifica la cantidad de proteína celular que permanece retenida en el cultivo en comparación con un cultivo control de células vivas, se obtiene un indicador directo del porcentaje de células vivas presentes.

Este fundamento es el que se utiliza en el método de Bradford (1976) para la cuantificación de proteínas totales presente en los cultivos. El método se basa en la tinción de proteínas con azul de Comassie (G-250) y posterior lectura colorimétrica a 595 nm [83].

Se sembraron células en placas de 12 pocillos y se mantuvieron a 37°C y 5% CO_2 hasta alcanzar una confluencia del 80%, momento en el cual se realizó el contacto con los disolventes. En esta prueba, se testaron todos los disolventes bajo estudio en todas las líneas celulares a la máxima concentración probada en el ensayo de viabilidad celular, 2000 mg/L.

Transcurridas 24 horas de contacto de cada línea celular con el disolvente a testar, se procedió al lisado de las células. Para ello, se lavaron dos veces los pocillos con PBS y con un rascador se lisaron recogiéndolas en 500 µL de PBS. Las muestras se congelaron y descongelaron a -20°C, al menos 3 veces para favorecer la rotura de la pared celular. Para la retirada de restos celulares, se centrifugó a 2500 rpm durante 4 minutos en la centrífuga (Heraeus Biofuge R) conservando el sobrenadante donde se encuentran las proteínas.

Para la realización de este ensayo, se han seguido las instrucciones indicadas en el Kit de Ensayo de Proteínas Comassie (Thermofisher). Inicialmente, se realizó una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA disueltas en PBS en un rango entre

0 y 25 µg/mL. Para realizar la cuantificación, se mezcló 150 µL de cada solución muestra con 150 µL del reactivo azul de Comassie en placas de 96 pocillos por triplicado. La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 595 nm en el lector de microplacas (BioTek Sinergy H1). Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la recta de calibrado realizada con BSA. El contenido de proteína celular total se presentó como porcentaje respecto al control asignando el 100% a la media de los valores del control.

4.3.3 Análisis de la morfología celular in vivo

Cuando un cultivo celular se encuentra en contacto con un tóxico, se pueden observar anomalías en la morfología habitual de la célula. La observación de células vivas puede realizarse durante un pequeño periodo de tiempo y permite visualizar daño celular y valorar el efecto de tóxicos sobre diferentes dianas celulares como pueden ser la contracción celular o picnosis [84]. Con el efecto de contracción las células pueden sufrir una disminución del tamaño, aumento de la densidad del citoplasma y mayor empaquetamiento de orgánulos. La picnosis es el resultado de la condensación de cromatina [85]. Además, este proceso puede resultar de utilidad como paso previo a un estudio más profundo a nivel subcelular y puede realizarse con facilidad por microscopía óptica de contraste de fase. Estos cambios morfológicos pueden deberse a procesos iniciales de apoptosis [86].

Las diferentes líneas celulares se pusieron en contacto con cada uno de los disolventes a la concentración máxima testada de 2000 mg/L utilizando placas de 12 pocillos. Transcurridas 24 horas de contacto con los disolventes, se procedió a la visualización de los mismos con un microscopio invertido (Nikon TS100F); la captura de imágenes se realizó con una cámara Nikon E3CMOS acoplada al mismo. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ.

4.3.4 Detección de cúmulos lipídicos

Cuando los cultivos celulares se encuentran en contacto con un xenobiótico, las células pueden inducir procesos de estrés celular. Uno de los mecanismos que se

desarrollan ante este proceso se relaciona con el cúmulo de lípidos en el citoplasma celular. El rojo Nilo (RN) es un colorante derivado de la oxazina, muy lipofílico que se utiliza para teñir lípidos neutros intracelulares. En condiciones normales, el rojo Nilo no es fluorescente pero en ambientes ricos en lípidos, el reactivo se acumula y pasa a emitir una fluorescencia de color amarillo-oro que permite identificar los acúmulos de lípidos intracelulares.

Para la realización de este ensayo, se dispusieron células en placas de 12 pocillos. Cuando se encontraron en confluencia del 80%, se pusieron en contacto durante 24 horas con cada uno de los disolventes a 2000 mg/L de concentración. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado con PBS de cada uno de los pocillos y se añadió una mezcla de formaldehído al 10% (v/v) en PBS durante 10 minutos, solución fijadora. Tras este tiempo, se desechó la mezcla y se dejó secar al aire para teñir cada pocillo con una disolución preparada en fresco de 0,1 mg/mL de rojo Nilo (Sigma-Aldrich) en PBS durante 5 minutos. La solución de rojo Nilo se retiró y se lavó cada pocillo una vez con 1 mL de PBS.

A continuación, se procedió a la visualización de cada pocillo en un microscopio de óptica invertida de fluorescencia (Olympus IX81). La longitud de onda utilizada para la excitación fue 450-500 nm y la longitud de onda de emisión > 528 nm. Las imágenes fueron adquiridas usando el software de visor Olympus FV10-ASW 3.0 y fueron procesados con el programa ImageJ. La captura de las imágenes fue realizada durante los 5 minutos siguientes a la tinción.

4.3.5 Genotoxicidad: fragmentación de ADN

Las células pueden generar mecanismos de defensa ante la exposición a agentes externos. La exposición de células a agentes tóxicos puede provocar alteraciones en los cultivos celulares y, más específicamente, daño en el ADN provocando su fragmentación.

El patrón de fragmentación de ADN por acción de un agente tóxico se puede detectar mediante extracción de ADN, separación mediante electroforesis en gel de

agarosa y posterior visualización. La comparación con los patrones de ADN obtenidos en controles negativos y positivos (genotóxicos), permite determinar si se ha producido dicha fragmentación. Se trata de una metodología cualitativa, fácil, rápida y relativamente económica, pero su principal desventaja es que detecta fragmentación de ADN en estados avanzados de apoptosis.

Para la observación de la posible fragmentación de DNA por el contacto con los disolventes, se sembraron células en placas de 12 pocillos y se mantuvieron a 37°C y 5% CO_2 hasta alcanzar una confluencia del 80%. En ese momento, se realizó el contacto con los disolventes bajo estudio a 2000 mg/L en todas las líneas celulares. Además, en cada ensayo se puso un control negativo con células sin tratar y un control positivo de H_2O_2 al 0,1%.

Transcurridas 24 horas de contacto de cada línea celular con el disolvente a testar, se procedió a recuperar todas las células existentes en cada pocillo. Para ello, se utilizó un rascador celular y se recuperó todo el medio con las células. Posteriormente, se centrifugó cada solución a 500 g durante 4 minutos en la microcentrifuga (Heraeus Pico17). Se desechó el sobrenadante y se lavó y resuspendió el pellet celular con 500 µL de PBS estéril. Tras centrifugar una vez más cada solución, se disolvió el pellet en PBS estéril y se procedió a la extracción del ADN celular haciendo uso del kit de QIAGEN (DNeasy® Blood & Tissue Kit) y siguiendo las instrucciones del mismo.

Tras obtener la fracción que contiene el ADN celular, 15 µL de cada fracción se mezcló con 2 µL de azul de bromofenol (Panreac AppliChem). Además, se incluyeron 2 µL del marcador de Peso Molecular VII (Roche). Todo ello, se sometió a electroforesis en gel de agarosa (1.2%) teñido con Gel-Red (Biotium®) durante 5 minutos a 45V seguidos de 55 minutos a 100V. Posteriormente se visualizaron en el sistema de documentación de geles (Gel Doc™ EZ, Biorad).

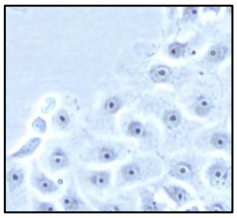
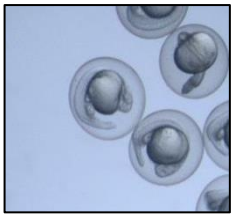
4.4 Estadística

Los valores se expresaron como la media ± el error estándar de la media (EEM). Los valores de IC_{50} y sus intervalos del 95% de confianza fueron obtenidos por regresión no lineal. Para el análisis estadístico entre los valores control y los valores obtenidos en cada concentración se utilizó un test de Kruskal-Wallis y un post test de comparación múltiple de Dunn's con un nivel de significancia de $p<0,05$.

Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.

4

Resultados y Discusión

1. SELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE ESTUDIO

Para alcanzar el primer objetivo "seleccionar los compuestos de interés a estudiar", se analizó la situación de la industria química actual y la información existente sobre disolventes. Además, se ha incluido información sobre la obtención, procedencia y aplicación de los compuestos.

Como se mencionó en la Introducción, la *Green Chemistry* considera a cuatro grandes grupos de compuestos como disolventes verdes: los disolventes fluorados, los líquidos iónicos, los fluidos supercríticos y los disolventes derivados de la biomasa [10]. En los últimos años, se ha considerado otro grupo de disolvente candidatos a considerarse verde: se trata de los disolventes DES (*Deep Eutectic Solvents*), de características análogas a los líquidos iónicos [11]. Todos estos disolventes se han denominado inicialmente como verdes por basarse en los principios de la *Green Chemistry* mencionados con anterioridad [3]. Sin embargo, se ha comprobado que los compuestos fluorados no son tan inocuos, ya que pueden presentar efectos adversos en el sistema inmune, en la función neuroendocrina o en los potenciales de membrana [87]. Hasta hace unos pocos años, los líquidos iónicos se consideraron como una alternativa a los disolventes tradicionales, sin embargo varios estudios han demostrado que, en algunas ocasiones, la toxicidad de estos compuestos es mayor de la esperada [88, 89]. Por último, para la obtención de fluidos supercríticos se requiere de una gran inversión económica [5].

En el caso de los disolventes de la biomasa, a *priori*, parecen presentar mejores características ambientales y para la salud que el resto de disolventes verdes: en parte por su procedencia de fuentes sostenibles, y por otra parte, por algunas de las propiedades características que se han encontrado sobre ellos, como pueden ser la baja presión de vapor de gran parte de esos disolventes o su baja flamabilidad. Asimismo, el uso de este grupo de disolventes ha aumentado considerablemente en los últimos años.

Los principales disolventes obtenidos a partir de biomasa son glicoles, levulinatos, furanos, lactatos, terpenos, furfurales o acrilatos [66]. De todos ellos, las familias de derivados del levulinato, lactato y furfural son las que, en principio, presentan propiedades fisicoquímicas más adecuadas para considerarse disolventes verdes. De ellas, se seleccionaron once compuestos relacionados estructuralmente y divididos entre estas tres familias. A continuación, en la figura 4.1 se presentan los compuestos seleccionados de cada una de las familias:

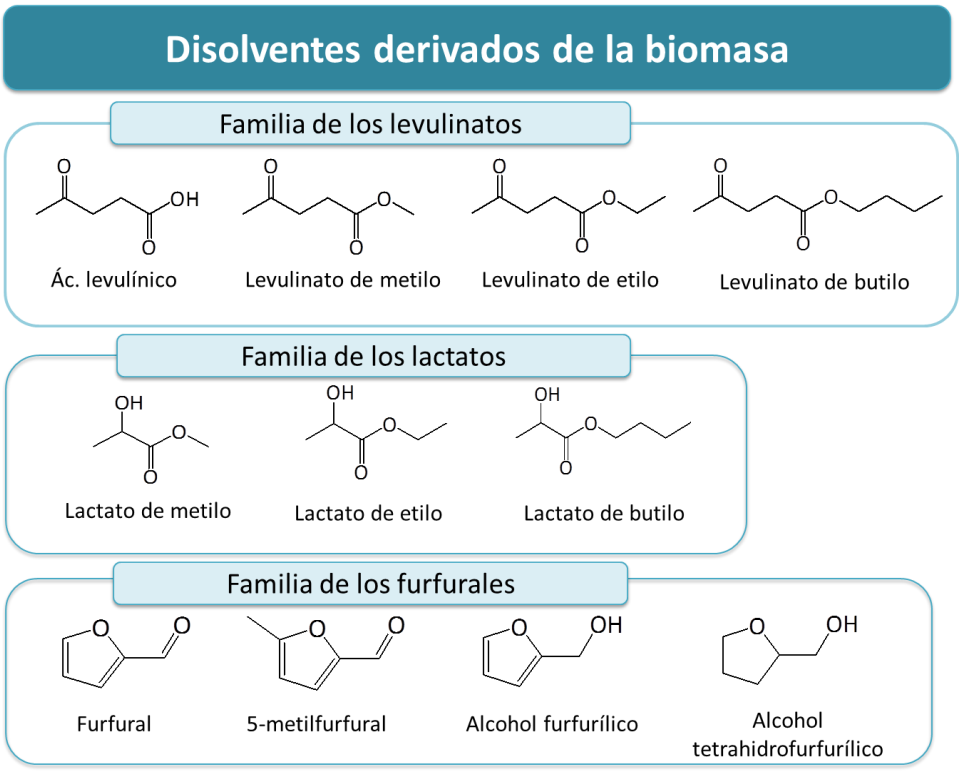


Figura 4.1. Compuestos y familias bajo estudio

Una vez seleccionados los compuestos, se estudió si cada uno de ellos cumple las características para poder considerarse disolventes verdes según la *Green Chemistry* [10, 67].

Los disolventes seleccionados presentan una baja presión de vapor y un punto de ebullición elevado, por lo que las concentraciones que pueden llegar a la atmósfera son bajas y, por tanto, su contaminación también [90-93]. En cuanto a la biodegradabilidad de los disolventes, *Clary et al*. [94] observaron que los ésteres del ácido láctico son biodegradables en agua. No se encontraron estudios sobre la biodegradabilidad de

alquil levulinatos, sin embargo, *Markiewicz et al.* [95] han realizado estudios de biodegradabilidad en otros ésteres de ácido levulínico, demostrando que los grupos funcionales carboxilo e hidroxilo son fácilmente degradables. Respecto a la biodegradabilidad de los furfurales no se encontraron estudios.

El coste de los compuestos seleccionados es bajo, lo cual es un punto favorable a la hora de su selección como disolventes. Para facilitar la disolución de compuestos en dichos disolventes es importante que presenten un amplio rango de polaridad. Todos los disolventes seleccionados presentan cierta polaridad, siendo los furfurales los disolventes más polares de aquellos seleccionados [90-93].

Todos estos disolventes provienen de fuentes renovables, ya que la biomasa es el recurso renovable de carbono fijado del que proceden. Es importante que un disolvente verde no tenga tendencia a bioacumularse, para conocer esta propiedad se puede relacionar con el coeficiente de reparto (*log P)*. Un alto valor del mismo indica bioacumulación; en el caso de los disolventes seleccionados, ninguno de ellos presenta valores de *log P* tan elevados, por lo que pueden considerarse no bioacumulables [90-93].

A pesar de cumplirse muchos de los principios establecidos por la *Green Chemistry,* los estudios sobre la toxicidad y ecotoxicidad de los compuestos de cada familia son escasos y se han realizado de manera aislada [96, 97] impidiendo un análisis de sus efectos en el medio ambiente y en la salud humana de manera completa. Además, muchos de los resultados referentes a la ecotoxicidad y toxicidad de estos compuestos provienen de experimentos predictivos. Es por ello que se detectó la necesidad de realizar un estudio sistemático y en profundidad de las tres familias. De esta forma, se podrá disponer de información suficiente para poder clasificar estos disolventes como verdes, con garantías y rigor científico, pudiendo favorecer su uso frente al de los disolventes tradicionales. Igualmente, estos estudios sobre la ecotoxicidad y toxicidad servirán para conocer cómo manipular los disolventes y cómo afectan al medio ambiente y a la salud humana.

En la tabla 4.1 se recopila de manera gráfica aquella información de cada una de las familias disponible en bibliografía en base a las propiedades de disolventes verdes. En el caso de la toxicidad, se observaron datos aislados de algunos compuestos de las familias, pero éstos no fueron realizados de manera completa.

Tabla 4.1. Resumen de propiedades de disolventes verdes estudiadas para las tres familias seleccionadas. (*) No existen estudios a nivel completo de todos los compuestos de la familia.

Características	Familias		
	Levulinatos	**Lactatos**	**Furfurales**
Baja presión de vapor	√	√	√
Elevado punto de ebullición	√	√	√
Biodegradabilidad	√	√	*
Bajo coste	√	√	√
Polaridad	√	√	√
Procedencia de fuentes renovables	√	√	√
No bioacumulable (*log P*)	√	√	√
No tóxico	*	*	*

A continuación se presentan las principales características, usos y obtención de cada uno de los compuestos seleccionados.

1.1. Familia de los levulinatos

De esta familia de disolventes se estudiaron el ácido levulínico y los alquil ésteres del mismo: levulinato de metilo, levulinato de etilo y levulinato de butilo.

El ácido levulínico es un líquido transparente que dispone de un grupo cetona y un grupo carboxílico, es soluble en agua, alcoholes, ésteres, cetonas y éteres. La obtención del ácido levulínico se realiza en la actualidad a partir de glucosa, la cual procede de hidrólisis de celulosa [98-101]. Dado que la biomasa ha emergido como una fuente de carbono abundante y relativamente económica, en la actualidad se sigue

investigando en el desarrollo de procesos de obtención del ácido levulínico mejorando los procesos catalíticos actuales, como por ejemplo, utilizando líquidos iónicos [102].

El ácido levulínico es un compuesto químico versátil con numerosos usos potenciales, ya que puede usarse como componente en plastificantes, resinas, aditivo alimenticio, agente antimicrobiano para alimentos, tintes textiles o anticongelantes, entre otros [100, 101, 103]. Son conocidas también sus propiedades como desinfectante de patógenos o antimicrobiano por lo que, podría utilizarse en ciertos alimentos como inhibidor de crecimiento de bacterias y como alternativa eficaz a otros ácidos como el acético [104].

Debido a su grupo carboxilo, el ácido levulínico puede dar con facilidad reacciones de esterificación. Una manera habitual de obtener ésteres del ácido levulínico es someter la reacción a altas temperaturas en presencia de un ácido [105]. También se pueden obtener alquil levulinatos partiendo de otros reactivos como pueden ser monosacáridos, disacáridos y otros polisacáridos o a partir de alcohol furfurílico, en cualquier caso, en presencia de catalizador [106]. Los alquil ésteres de cadena corta tienen potenciales aplicaciones en la industria alimenticia, de fragancias, generación de sabores, formación de polímeros, revestimientos de látex… aunque su principal aplicación es la de formar parte de aditivos para el diésel y biodiesel o como disolventes para otras reacciones [107-109].

1.2. Familia de los lactatos

De esta familia se investigaron los alquil ésteres del ácido láctico: lactato de metilo, lactato de etilo y lactato de butilo.

En la actualidad existen varios derivados del ácido láctico, algunos de ellos son nuevos productos químicos y otros son la base de rutas biológicas. Los ésteres utilizados en este trabajo se obtienen por reacciones de esterificación del ácido láctico. Estos compuestos forman parte de la composición de pinturas, gomas, aceites, detergentes,

productos de cuidado personal, fragancias, aditivos de alimentos [110] y también como adyuvantes en la preparación de fármacos de administración transdérmica [111].

La principal aplicación del lactato de etilo es como disolvente, debido a su elevado punto de ebullición, baja presión de vapor y baja tensión superficial, por lo que algunos expertos proponen este compuesto como reemplazo a muchos disolventes tradicionales [112] tales como el tolueno, acetona, xileno o N-metilpirrolidona (NMP). El lactato de etilo es biodegradable y ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA), no es carcinogénico y es fácil de reciclar [113].

1.3. Familia de los furfurales

De esta familia se estudiaron cuatro compuestos derivados del furfural: dos de ellos con una cadena lateral con un grupo aldehído (furfural y 5-metilfurfural) y los otros dos con una cadena lateral con grupo alcohol (alcohol furfurílico y alcohol tetrahidrofurfurílico).

Los compuestos de esta familia de disolventes se preparan a partir de fuentes de carbohidratos derivados de la biomasa. Estos compuestos sirven como punto de partida para producir otros compuestos químicos que no pueden ser obtenidos a partir de la biomasa [114]. La deshidratación de pentosas hemicelulósicas de la biomasa en medio ácido da lugar a la obtención de furfural [115]. Una de las transformaciones importantes del furfural es al alcohol furfurílico que industrialmente se realiza por hidrogenación catalítica. El alcohol furfurílico sirve, a su vez, como compuesto de partida para la producción del alcohol tetrahidrofurfurílico [116]. Por otro lado, el 5-metilfurfural puede obtenerse a partir de la fermentación del ácido acético en condiciones no conocidas [117].

El furfural presenta aplicaciones potenciales, aunque su principal aplicación es el ser material de partida para la síntesis de otros compuestos, como ya se ha mencionado previamente. Además, se ha comprobado que dispone de propiedades nematicidas y fungicidas, ya que puede impedir el crecimiento del hongo *Penicillium* a concentraciones

muy bajas en condiciones de crecimiento muy favorables [114]. Además, tanto el furfural como el alcohol furfurílico presentan inhibición de la actividad microbiana, inhibiendo el crecimiento de las bacterias *Salmonella* y *Bacillus subtilis* al inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa. El alcohol furfurílico también tiene una gran aplicación en la industria química de fabricación de resinas, producción de resinas líquidas, en distintas síntesis químicas e incluso en química farmacéutica [114]. Además, es un intermedio químico importante para la fabricación de fragancias, vitamina C y lisina [115].

El 5-metilfurfural es la base de muchos otros compuestos dada su reactividad por sus grupos funcionales [118]. Se utiliza de manera regulada para dar sabor al vinagre balsámico tradicional y permite comprobar si algunos alimentos, como por ejemplo la miel, han sido adulterados, ya que aumenta considerablemente su concentración en estos casos [119]. El alcohol tetrahidrofurfurílico tiene su principal uso como disolvente tanto de herbicidas, pesticidas o biocidas y en una alta variedad de productos agrícolas [120].

2. *PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS*

Para la consecución del objetivo 2 “Recopilar información disponible sobre las propiedades fisicoquímicas de los disolventes seleccionados” se realizó una búsqueda bibliográfica que se centró en analizar distintas propiedades de interés para la caracterización intrínseca de los compuestos, así como para el estudio de ecotoxicidad y toxicidad a realizar posteriormente.

La caracterización fisicoquímica de un compuesto requiere la determinación de un gran número de propiedades en diferentes condiciones de trabajo, que aporten la información necesaria acerca de cómo va a ser su comportamiento. En este trabajo, la búsqueda de información relativa a propiedades fisicoquímicas de los disolventes bajo estudio, se centró en aquellas que faciliten conocer cómo se van a encontrar los

compuestos en el medio ambiente acuático y cómo pueden afectar a los diferentes organismos, ecosistemas e, incluso, a la salud humana. Del mismo modo, estas propiedades fisicoquímicas analizadas afectan a las rutas potenciales de exposición a las sustancias, a la biodisponibilidad e incluso a la biodegradación [121]. El estudio de las propiedades de los compuestos se analizó desde el punto de vista de cada familia en su conjunto y no sólo como compuestos aislados.

Es importante señalar que las familias estudiadas son diferentes y, por lo tanto, no siempre fue posible realizar una generalización para todas ellas. Además, se debe tener en cuenta las diferencias estructurales en los compuestos dentro de una misma familia. Parte de la complejidad a la hora de entender las propiedades de los compuestos, proviene de la necesidad de conocer las interacciones intermoleculares presentes.

El conocimiento de las propiedades físicas y químicas de los compuestos ayuda a estimar en qué parte del medio ambiente acuático se pueden alcanzar las mayores concentraciones de los compuestos y la capacidad de los compuestos para permanecer donde fueron liberados o para transportarse a otros compartimentos ambientales. Teniendo en cuenta también su estructura proporcionan información sobre el tipo de reacciones químicas y biológicas que pueden generar, la forma química en la que se encontrarán en el agua e, incluso, la persistencia [122]. Por otro lado, algunas propiedades fisicoquímicas ayudan a conocer el proceso biológico que desencadenarán estas sustancias en un organismo, por lo que es importante valorar el efecto de las mismas con el fin de llegar a conocer la toxicidad que puedan producir así como los riesgos asociados [123].

Por todo ello, las propiedades fisicoquímicas seleccionadas y que permitieron estimar su comportamiento en el medio ambiente, así como su implicación a nivel celular en el organismo fueron: la solubilidad en agua, la concentración de agregación crítica, la densidad, el punto de ebullición y el coeficiente de reparto.

La *solubilidad en agua* (*s*) depende de la capacidad que tiene un compuesto para formar puentes de hidrógeno con el agua. Por ello, la solubilidad será mayor conforme más grupos funcionales capaces de formarlos tenga (grupos hidrofílicos). La cantidad de átomos de carbono asociados al grupo funcional actúa como agente limitante de su solubilidad en agua (parte lipofílica de la molécula). Por tanto, la estructura molecular del compuesto (extensión y posición de las ramificaciones) [124], así como su forma y tamaño debe tenerse en cuenta para determinar esta propiedad. Aquellos compuestos que presenten una alta solubilidad en agua, se encuentran disueltos en el medio acuático y con una alta disponibilidad para los organismos presentes en él [125]. Su disposición está en relación con la toxicidad, patogenicidad y actividad biológica [126]. Además, la forma y tamaño de los compuestos son factores importantes que pueden generar efectos biológicos como el estrés oxidativo, daño en el ADN o cambios en la actividad metabólica, entre otros [123].

La *concentración de agregación crítica* (*c.a.c.*) es aquella concentración a la cual comienzan a aparecer agregados en forma de micelas, lo cual puede ocurrir en moléculas anfipáticas, aquellas que disponen en su estructura de una parte hidrófoba y otra hidrofílica. Este tipo de compuestos actúan como electrolitos normales en disoluciones acuosas muy diluidas, pero a medida que aumenta la concentración del compuesto químico, se observan cambios en sus propiedades físicas. Este comportamiento se explica a través de la existencia de agregados organizados denominados micelas, en los cuales la cadena hidrocarbonada se orienta hacia el interior tendiendo a escapar de la masa acuosa y la parte hidrófila permanece en contacto con el agua. El agua forma una estructura cerrada gracias a las interacciones por puente de hidrógeno que presenta, permitiendo formar clústers de moléculas de agua que presentan cavidades de un tamaño específico que pueden acomodar cadenas no polares [127]. Pero para una molécula, en este caso orgánica y a una temperatura dada, sólo una cantidad determinada de monómeros podrán acomodarse en tales cavidades, de manera que una adición superior de moléculas orgánicas dará lugar a la formación de micelas. Esta propiedad está relacionada con la biodisponibilidad del compuesto. El estudio de este comportamiento de agregación ha sido utilizado con

anterioridad para comprender mejor el efecto tóxico de compuestos químicos [128]. Cuando las moléculas no se encuentran en agregación, se espera una incremento de la biodisponibilidad del compuesto [129]. A pesar de reducir el efecto tóxico, la formación de agregados favorece la internalización en células [123]. Cuanto menor es el valor de esta propiedad, mayor es la tendencia a la agregación; además, la variación de sus valores es igual que la que se observa con la solubilidad en agua [130].

La *densidad* (ρ) es una de las propiedades intrínsecas más importantes de un disolvente, ya que ofrece información sobre la organización interna del compuesto y su empaquetamiento molecular y, por tanto, depende del tamaño y la forma de las moléculas, así como de las interacciones que experimentan. Sobre todo, desde el punto de vista del impacto sobre el medio ambiente acuoso, sirve para conocer cómo se encuentra el compuesto en los distintos cuerpos de agua. Conocer los valores de densidad de las sustancias permite elegir el método más adecuado para poder separarlas en el caso de que existan mezclas, por ejemplo, si se produce un vertido [131]. Conocer el valor de la densidad de cada uno de los compuestos, permite saber dónde es más fácil encontrar los compuestos cuando son liberados a los medios acuosos.

El *coeficiente de reparto* (*log P*) es el cociente de las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema de dos solventes inmiscibles (octanol y agua) y nos facilita información sobre la lipofilicidad o hidrofobicidad de las sustancias [132]. La hidrofobia juega un papel importante en muchos aspectos relacionados con la peligrosidad de las sustancias químicas y sus posibles aplicaciones, tales como el transporte a través de membranas (toxicidad), difusión en medios acuosos (contaminación), miscibilidad con agua (reacciones bifásicas), etc. Del mismo modo, esta propiedad juega un papel importante en la absorción, transporte, metabolismo y distribución dentro del organismo de las sustancias químicas [133]. De hecho, el parámetro de *log P* se correlaciona con procesos físicos y biológicos tales como interacción con proteínas o entre sistemas de membranas y agua [134]. El coeficiente de reparto, permite cuantificar el balance entre la hidrofilia y la lipofilia de una molécula. Así, los valores mayores a 1 indican que el compuesto es más soluble en lípidos que en

agua y se dice que es lipófilo o hidrófobo. Por el contrario, los valores inferiores a 1 indican una mayor solubilidad en agua que en lípidos, característica común de los compuestos hidrófilos [135]. Como ya se mencionó con anterioridad, aquellos compuestos más hidrófobos pueden atravesar las membranas y acumularse más fácilmente en organismos o agregarse a otros compuestos del medio acuático. Esta propiedad, no sólo ofrece una idea sobre el modo en el que se encuentra el compuesto sino también sobre su biodisponibilidad o biodegradación. Así, los compuestos tienden a bioacumularse cuando su valor de *log P* sea mayor que 4,3 [9]. Por todo ello, el conocimiento del coeficiente de reparto resulta crucial para sustancias químicas que puedan disponer de una posible actividad biológica.

Por último, el *punto de ebullición* (T_{eb}) del compuesto se encuentra relacionado con el carácter de volatilidad, por lo que un valor bajo de punto de ebullición muestra una habilidad mayor de liberación del compuesto a la atmósfera y, por tanto, el compuesto será más contaminante para la misma y menos para el medio acuático. Es por ello que esta propiedad puede relacionarse con el carácter de los compuestos orgánicos volátiles (*COV*). Será necesario conocer la estructura molecular del compuesto para saber el tipo de interacciones intermoleculares que presenta la molécula. A mayor número de interacciones que pueda establecer, más alto será el punto de ebullición y menos su presión de vapor.

A continuación, se presenta la información encontrada en bibliografía sobre las características estructurales y las propiedades fisicoquímicas seleccionadas para cada familia de compuestos.

2.1. Familia de los levulinatos

Esta familia se caracteriza por la presencia de un grupo éster y un grupo cetona lo que le confiere su carácter polar. En la figura 4.2 se puede observar la estructura de los cuatro compuestos que se estudiaron en esta familia. Estos grupos químicos pueden estabilizarse por interacciones polares y, además en el caso del ácido levulínico, puede establecer puentes de hidrógeno por la presencia de un grupo ácido. Entre las cadenas

alquílicas también pueden darse interacciones de Van der Waals, las cuales son mayores cuanto mayor es la longitud de la cadena.

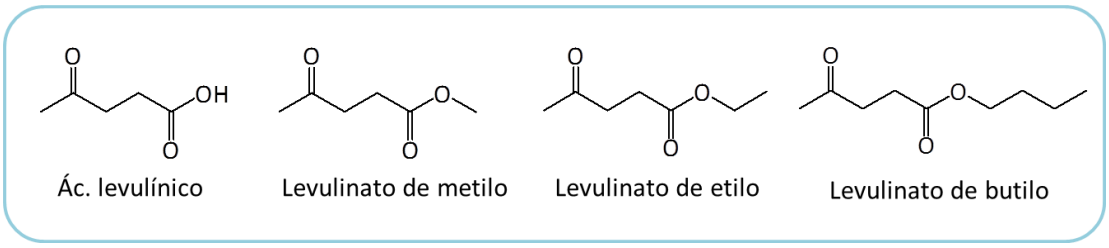


Figura 4.2. Estructuras de los disolventes de la familia de los levulinatos.

Los primeros estudios específicos sobre las propiedades de los alquil levulinatos datan de principios del siglo pasado. Estos estudios recogen propiedades fisicoquímicas como el punto de ebullición, densidad, índice de refracción de ésteres de levulinato y solubilidad en agua [136-138]. El avance de la *Green Chemistry* y el desarrollo de disolventes verdes han ocasionado que en los últimos años se haya profundizado en el estudio de las propiedades de disolventes derivados de la biomasa para estas nuevas aplicaciones. *Lomba et al.* realizaron una amplia caracterización fisicoquímica y termofísica de disolventes derivados de la biomasa en los que se incluyeron la familia del ácido levulínico y sus derivados [91, 130, 139].

A continuación, se recoge en la tabla 4.2 los valores obtenidos en la bibliografía sobre las principales propiedades fisicoquímicas seleccionadas.

Tabla 4.2. Principales propiedades fisicoquímicas de la familia de los levulinatos [91, 130]. El valor de c.a.c. es a 25°C y la ρ a 22,5°C.

Propiedad	**Ácido levulínico**	**Levulinato de metilo**	**Levulinato de etilo**	**Levulinato de butilo**
***s* (% masa)**	soluble	soluble	13,75	1,09
***c.a.c.* (mol/kg)**	0,596	0,346	0,325	0,021
ρ (g/cm^3)	-	1,047876	1,009988	0,972175
log P	- 0,14	- 0,17	0,38	1,36
T_{eb} (°C)	250,6	197,35	195,94	237,3

En dicha tabla se observa como el ácido levulínico y el levulinato de metilo, al ser totalmente solubles, se encontrarán completamente disueltos en el medio acuoso. Los valores de solubilidad encontrados para los alquil ésteres del ácido levulínico son coherentes con otros resultados obtenidos en bibliografía [138]. Observando los valores de *c.a.c.*, el compuesto con mayor tendencia a la agregación en esta familia es el levulinato de butilo. En esta familia la relación existente entre ambas propiedades con la estructura molecular es evidente, ya que la solubilidad y la *c.a.c.* disminuyen conforme aumenta la longitud de la cadena, la cual es hidrofóbica [127].

La relación anteriormente mencionada, también fue observada para los valores de densidad, debido a que los compuestos con cadenas alquílicas más pequeñas están más empaquetados y, por tanto, tienen mayor densidad. En este caso es destacable que el levulinato de butilo presenta una densidad inferior a la del agua por lo que cabe esperar encontrarlo en capas más superficiales del medio acuático, a diferencia del resto de compuestos de la familia. Teniendo en cuenta los valores de *log P*, el levulinato de butilo (*log P* > 1) presenta mayor tendencia a atravesar membranas lipídicas de organismos relacionándose con una mayor toxicidad. No obstante, se pudo determinar que ninguno de los compuestos estudiados puede clasificarse como bioacumulable, ya que todos los valores de su *log P* son menores a 4.3. En el caso del coeficiente de reparto, su valor aumenta conforme mayor es la hidrofobicidad del compuesto o lo que es lo mismo para esta familia, cuanto más larga es la cadena alquílica.

Teniendo en cuenta todas las interacciones intramoleculares que pueden dar estos compuestos, el ácido levulínico es el que mayor punto de ebullición presenta debido a su posibilidad de formar puentes de hidrógeno por el grupo ácido. Esto hace que este compuesto sea el menos volátil. Se observó que los levulinatos de metilo y el de etilo presentan valores similares en su punto de ebullición y, además, son menores que el del resto de compuestos de la familia lo que indica un carácter volátil mayor. Los puntos de ebullición de los alquil ésteres de esta familia presentaron valores similares a los encontrados en el estudio de *Cox and Dodds* [138], a excepción del levulinato de etilo que presentó un valor mayor al de *Lomba et al.* dado en la tabla 4.2.

2.2. Familia de los lactatos

Los compuestos de esta familia tienen en su estructura un grupo hidroxilo y un grupo éster, tal y como se observa en la figura 4.3. Estos grupos permiten estabilizar sus moléculas por interacciones polares, además de las interacciones dipolo-dipolo. A través del grupo hidroxilo pueden establecer puentes de hidrógeno y también es importante tener en cuenta las interacciones de Van der Waals entre cadenas alquílicas, mayores cuando mayor tamaño tengan éstas.

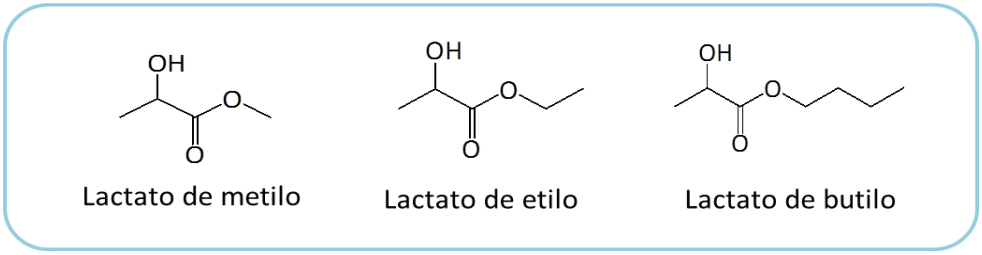


Figura 4.3. Estructuras de los disolventes de la familia de los lactatos.

Lomba et al. realizaron un estudio en profundidad de las propiedades termofísicas y fisicoquímicas de los tres compuestos [91, 92, 130] que permitieron disponer de los valores de las propiedades seleccionadas. En la tabla 4.3 se recogen las propiedades fisicoquímicas de interés.

Tabla 4.3. Principales propiedades fisicoquímicas de la familia de los lactatos [91, 92, 130]. El valor de c.a.c. es a 25°C y la ρ a 22,5°C.

Propiedad	**Lactato de metilo**	**Lactato de etilo**	**Lactato de butilo**
***s* (% masa)**	soluble	soluble	4,12
***c.a.c.* (mol/kg)**	1,28	1,11	0,152
ρ (g/cm^3)	1,090228	1,031094	0,97975
log P	-0,76	0,17	0,63
T_{eb} (°C)	143,15	153,29	185,08

Se observa como el lactato de metilo y etilo son completamente solubles en agua, del mismo modo que lo determinó *Rehberg and Dixon* [140], indicando que estos

dos compuestos se encuentren disueltos en el medio acuático y, por tanto, más disponibles a los distintos organismos acuáticos. En cambio, el lactato de butilo presentó un valor menor de solubilidad (4,12) también consistente con el resultado de 4,38 g/100 mL obtenido por *Rehberg and Dixon* [140]. Respecto a los valores de *c.a.c*., el lactato de butilo sería aquel compuesto con mayor tendencia a formar agregados a una menor concentración del mismo.

En el caso del lactato de butilo, su densidad es menor que la del agua por lo que se encontrará en capas más superficiales de los compartimentos acuáticos. De nuevo, *Rehberg and Dixon* proporcionaron valores experimentales de densidad, en este caso medidas a una temperatura algo inferior (293,15 K) [140]. *Sanz et al.* [141], *Aparicio* [142] y *Chen and Chu* [143] ofrecieron datos sobre el levulinato de metilo como son la densidad a una temperatura ligeramente superior (298 K). Para el lactato de etilo, otros estudios aportaron valores de densidad desde 278,15 a 343,15 K, además de presiones de vapor del compuesto [113, 144, 145]. En el caso del lactato de butilo se encontraron valores para la densidad a 293,15 K [110].

Las relaciones encontradas entre la estructura y las propiedades anteriormente mencionadas, fueron las mismas que las observadas para la familia de los levulinatos. Así, la *c.a.c.* y la densidad disminuyen conforme aumenta la longitud de la cadena alifática. Por el contrario, el valor de *log P* incrementa conforme aumenta el tamaño de la cadena alifática, pero en ningún momento supera el valor de 1, por lo que estos compuestos no son considerados lipófilos. En contraste con los ésteres del ácido levulínico, estos ésteres disponen de un grupo hidroxilo que les confiere mayor afinidad con el agua.

Teniendo en cuenta todas las estructuras moleculares de los compuestos de esta familia y sus interacciones intramoleculares, el carácter volátil de los compuestos de esta familia aumenta cuando disminuye la longitud de su cadena lateral, siendo el lactato de metilo el compuesto de esta familia que mayor carácter COV tiene.

2.3. Familia de los furfurales

En esta familia, las diferencias estructurales existentes en sus compuestos son distintas a las observadas para las otras dos familias estudiadas. En la figura 4.4 se observa que todos los compuestos presentan un anillo unido por un grupo éter, pero con dos estructuras sustituyentes diferenciadas: en el caso del furfural y el 5-metilfurfural, la cadena lateral tiene un grupo aldehído que puede estabilizarse por interacciones dipolo-dipolo; en el caso del alcohol furfurílico y el alcohol tetrahidrofurfurílico, esta cadena lateral contiene un grupo hidroxilo que podrá dar lugar a interacciones por puente de hidrógeno.

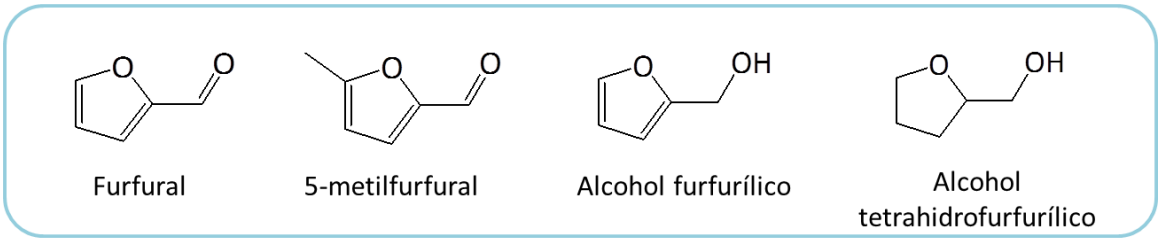


Figura 4.4. Estructuras de los disolventes de la familia de los furfurales.

Respecto al estudio fisicoquímico de esta familia de disolventes encontrado en bibliografía, *Sako et al.* [146] determinaron el equilibrio líquido-vapor de sistemas que contienen dióxido de carbono, agua y furfural; o *Senol et al.* [147] y *Grushova et al.* [148] varias propiedades del alcohol tetrahidrofurfurílico como la densidad, índice de refracción o viscosidad a 293,15 K y 333,15 K. *Guerrero et al*. [139] realizaron medidas de densidad a diferentes temperaturas de varios disolventes derivados de la biomasa, entre ellos, del alcohol furfurílico. Posteriormente, *Lomba et al.* estudiaron propiedades de agregación y la solubilidad de los cuatros compuestos de la familia [130] y algunas propiedades termofísicas del 5-metilfurfural y el alcohol tetrahidrofurfurílico [90].

En la tabla 4.4 se recopilan los valores de las propiedades fisicoquímicas seleccionadas a estudiar.

Tabla 4.4. Principales propiedades fisicoquímicas de la familia de los furfurales [90, 130, 139]. El valor de c.a.c. es a 25°C y la ρ a 22,5°C.

Propiedad	Furfural	5-metilfurfural	Alcohol furfurílico	Alcohol tetrahidrofurfurílico
***s* (% masa)**	8,17	3,45	soluble	soluble
***c.a.c.* (mol/kg)**	0,475	0,215	0,982	1,63
ρ (g/cm^3)	1,154805	1,103203	1,130269	1,050064
log P	0,43	0,69	0,25	-0,28
T_{eb} (°C)	159,42	187,48	163,29	176,29

Los dos compuestos de esta familia con grupo alcohol son totalmente solubles a diferencia del furfural y el 5-metilfurfural, lo cual implica que su disponibilidad en el medio acuático será mayor. Esta diferencia comparativa también se observó con la *c.a.c.*, de modo que este valor es mayor en los compuestos alcohólicos. En esta familia, el 5-metilfurfural es el compuesto con mayor tendencia a formar agregados y, además, es el compuesto menos soluble.

En el caso de la densidad, todos los compuestos presentan valores por encima de 1 g/cm^3, por lo que al ser liberados al medio acuático, se encontrarán en capas más profundas. El valor de densidad observado en la tabla 4.4 para el alcohol tetrahidrofurfurílico es coherente con el presentado por *Senol et al*. de 1,0551 medido a 293,15 K [147]. Respecto a la hidrofobicidad, ninguno de los compuestos de esta familia presenta valores de coeficiente de reparto superiores a 1 por lo que no son considerados lipófilos, destacando el alto carácter hidrófilo (valor negativo de *log P*) del alcohol tetrahidrofurfurílico.

El valor más alto de punto de ebullición se observó para el 5-metilfurfural y el más bajo para el furfural. No obstante, todos los puntos de ebullición son lo suficientemente altos, de modo que se descarta su volatilidad y, por tanto, su paso a la atmósfera.

La relación entre las diferentes propiedades estudiadas y la estructura de los compuestos varía en esta familia. Así, la solubilidad y la *c.a.c*. son mayores para los dos compuestos alcohólicos. Por el contrario, estos compuestos son los que presentaron los valores más bajos de *log P.*

Tras la revisión bibliográfica realizada de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos seleccionados, la información obtenida dio una idea aproximada sobre cuál puede ser el comportamiento de los mismos en el medio ambiente acuático y el comportamiento interno y actividad en los organismos.

3. ESTUDIO DE LA ECOTOXICIDAD

En esta parte del trabajo se llevó a cabo una caracterización ecotoxicológica, alcanzando el objetivo 3 "Realizar una evaluación ecotoxicológica", cuyos resultados se desarrollan a continuación.

Existen diversos ensayos de laboratorio para la determinación experimental de la toxicidad aguda de compuestos químicos en agua. Tal y como se comentó en el capítulo de "Material y métodos", se seleccionaron tres ensayos ecotoxicológicos normalizados utilizando organismos acuáticos:

- Inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria *V. fischeri* a 30 minutos
- Inmovilización del crustáceo *D. magna* a 24 horas
- Letalidad de embriones de pez *D. rerio* a 48 horas

Estos ensayos permiten valorar la toxicidad aguda provocada por los compuestos en tres organismos de distintos niveles de la cadena trófica (bacteria, crustáceo y vertebrado inferior). Los tres bioensayos se consideran representativos para poder valorar y predecir los efectos dañinos que los compuestos químicos pueden provocar en el medio ambiente acuático. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ensayos de ecotoxicidad no proporcionan una respuesta absoluta al riesgo que un compuesto

particular en agua puede provocar en la población humana y es por ello que se hace necesario completar con algunos estudios de toxicidad. La bibliografía mostró resultados previos de los compuestos en diferentes bioensayos y de forma aislada.

Con la realización de los tres bioensayos se obtuvieron los valores de EC_{50}/LC_{50}. Además, para el ensayo de letalidad con *D. rerio*, la información se completó mostrando los efectos teratógenos observados en los embriones a diferentes concentraciones testadas para cada disolvente.

A continuación, se presenta para cada familia la información disponible sobre ecotoxicidad en la revisión bibliográfica, así como los resultados obtenidos y su discusión para cada bioensayo.

3.1 Familia de los levulinatos

El primer estudio de ecotoxicidad publicado para esta familia de compuestos fue llevado a cabo por *Tischer et al.* [149] donde se determinó que el ácido levulínico es un compuesto químico no tóxico. Existe otro estudio, recogido en la base de datos *ECOTOX US-EPA*, en el que se presenta el mismo valor de LC_{50} a las 24h de exposición en tres especies diferentes de peces para este mismo compuesto [150]. Además, se dispone de concentraciones de toxicidad aguda calculadas teóricamente en organismos acuáticos en la base de datos *Canadian Categorization Results Database.*

El estudio más completo de esta familia evaluó la ecotoxicidad de los compuestos de esta familia en tres biomodelos acuáticos (*V. fischeri, D. magna y Chlamydomonas reinhardtii*) y un biomodelo terrestre (*Eisenia foetida*) [151]. El trabajo más reciente vinculado a este tipo de toxicidad fue llevado a cabo por *Bluhm et al.* [152] en el que se estudió la toxicidad en embriones de pez (FET) *D. rerio* (pez cebra) del levulinato de etilo.

En la tabla 4.5 se recopilan los distintos valores de toxicidad aguda encontrados en bibliografía para esta familia de disolventes en diferentes organismos acuáticos.

Tabla 4.5. Valores bibliográficos de concentraciones de toxicidad aguda, EC_{50}/LC_{50} (mg/L), en diferentes organismos para el ácido levulínico y derivados.

Bioensayo	**Ácido levulínico**	**Levulinato de metilo**	**Levulinato de etilo**	**Levulinato de butilo**
Peces (24h) [150]	10	-	-	-
C. reinhardtii (2h) [151]	1098,1 ± 13,7	18655,8 ± 986,1	6065,9 ± 757,8	1640,0 ± 127,0
***D. rerio* embriones** (48h) [152]	-	-	83	-

A continuación, en la tabla 4.6 se presentan los valores de EC_{50} y LC_{50} adquiridos del trabajo realizado por *Lomba et al.* [151] para esta familia de compuestos y los obtenidos para los embriones de *D.rerio* realizados en esta tesis doctoral.

Tabla 4.6. Valores de concentración de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) de la familia de los levulinatos para los bioensayos de V. fischeri, D. magna y embrión de D. rerio. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media.

Compuesto	**EC_{50}/LC_{50} (mg/L)**		
	V. fischeri [151]	***D. magna*** [151]	***D. rerio***
Ácido levulínico	5687 ± 1,32	6234 ± 466	23747 ± 1,04
Levulinato de metilo	883 ± 5	2761 ± 512	112,0 ± 1,03
Levulinato de etilo	185 ± 5	982 ± 66	81,53 ± 1,03
Levulinato de butilo	83 ± 3	151 ± 13	17,04 ± 1,29

En la tabla 4.6 se observa que el ácido levulínico presentó los valores más altos de EC_{50}, independientemente del ensayo realizado, por lo que este compuesto es el menos tóxico de toda la familia para *V. fischeri*, *D. magna* y *D. rerio*. Sin embargo, los resultados obtenidos bibliográficamente y presentados en la tabla 4.5 para las algas *C. reindhartii*, mostraron que el ácido levulínico fue el más tóxico de la familia [151]. Esto puede ser debido a que el ácido levulínico también es reconocido como un inhibidor de la biosíntesis de la clorofila en algas y plantas superiores [153], aunque los procesos que determinan este comportamiento no han podido ser demostrados.

Además, el valor experimental de LC_{50} obtenido para el levulinato de etilo en el test con embriones de *D. rerio* fue similar al presentado por *Bluhm et al.* (LC_{50} = 83 mg/L) [152]. Sin embargo, el resultado obtenido en nuestro trabajo para el ácido levulínico en *D. rerio* difirió en gran medida del obtenido en otro estudio bibliográfico (10 mg/L) [150], aunque éste no muestra información sobre la especie de pez utilizada y la medida experimental de toxicidad se obtuvo a diferente tiempo (24 horas).

Respecto a los organismos utilizados para la evaluación de ecotoxicidad, los peces fueron la especie más sensible al contacto con estos disolventes, hecho que también fue observable al presentar los valores bibliográficos de la tabla 4.5 donde la ecotoxicidad de las algas era considerablemente menor.

Analizando la relación entre la estructura de estos disolventes con la actividad ecotoxicológica encontrada, se observó que la variación de EC_{50} o LC_{50} (Tabla 4.6) fue la misma para los tres biomodelos. Por tanto, en estos organismos acuáticos, la toxicidad de un éster alquílico del ácido levulínico fue mayor cuanto mayor era la longitud de su cadena lateral. Este efecto ha sido observado en numerosos estudios con otros tipos de disolventes verdes, como son los líquidos iónicos en *V. fischeri* [154, 155] y *Lemna minor* [156] o los derivados del glicerol en *V. fischeri* [157]*, D. magna, C. reindhartii* o *D. rerio* [158, 159], entre otros, mostrando la existencia de una relación entre estructura y efecto ecotóxico.

A través del ensayo de la evaluación de la toxicidad en embriones *D. rerio*, se obtuvo también información sobre efectos subletales que los embriones vivos pueden presentar a diferentes concentraciones de los disolventes estudiados indicando posibles efectos teratogénicos.

En la figura 4.5 se presentan y detallan los fenotipos de los embriones expuestos a diferentes concentraciones de levulinato de butilo, el compuesto más ecotóxico de esta familia, tras 24 y 48 horas post exposición.

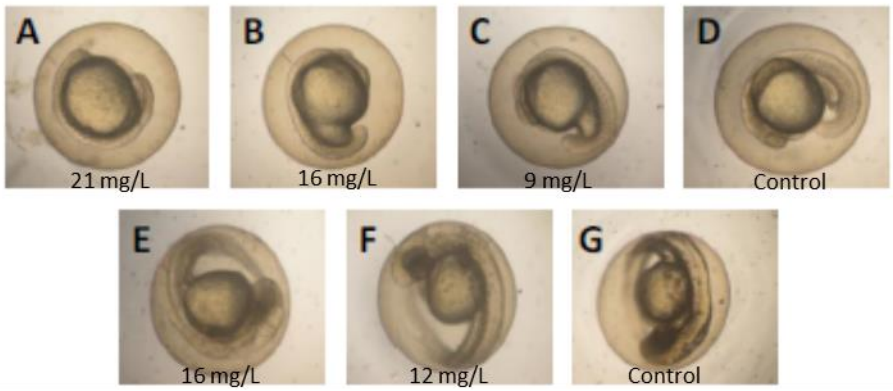


Figura 4.5. Imágenes representativas de los fenotipos de embrión de D. rerio encontrados después de 24 (A-D) o 48 horas (E-G) tras exposición a diferentes concentraciones del levulinato de butilo. Imágenes extraídas del informe de resultados de ZF Biolabs.

En los ensayos experimentales con este compuesto a las 24 hpf se observó que, concentraciones de 21 mg/L provocaron la muerte del embrión y la cola no se encontró separada (Fig. 4.5.A). Además, aunque las concentraciones de 16, 12 y 9 mg/L no resultaron tóxicas, sí se detectó un retraso del desarrollo embrionario (Fig. 4.5.B y C). El control negativo mostró el embrión vivo con 21 somitas (Fig. 4.5.D).

A las 48 hpf los embriones expuestos a levulinato de butilo estaban vivos, pero con una pigmentación ligeramente inferior al control, una circulación sanguínea lenta o indetectable y edema cardiaco, siendo este más sutil a la concentración de 12 mg/L que a 16 mg/L (Fig 4.5.E y F). El control negativo a las 48 horas estaba vivo (Fig 4.5.G). Tras los ensayos con este compuesto, se establece un límite de concentración de 9 mg/L por debajo de la cual no es esperable encontrar efectos teratogénicos.

La exposición del resto de los disolventes de esta familia produjo efectos subletales similares al levulinato de butilo en los embriones a concentraciones inferiores a la LC_{50} obtenida para cada uno de ellos. Estos efectos fueron encontrados a dosis por encima de 10300 mg/L para el ácido levulínico (LC_{50} = 23747 mg/L) y de 47 mg/L para el levulinato de metilo (LC_{50} = 112 mg/L) y para el levulinato de etilo (LC_{50} = 81,53 mg/L). Es por todos estos resultados que no sólo debe tenerse en cuenta el resultado de LC_{50} de cada disolvente sino los posibles efectos en concentraciones inferiores.

Del mismo modo, *Bluhm et al*. [152] observaron edema cardiaco por encima de 51 mg/L, ausencia de circulación sanguínea a 61 mg/L y alteraciones en la pigmentación de los embriones al exponerse a levulinato de etilo. Esto es coherente con lo obtenido para el mismo disolvente en esta tesis.

3.2 Familia de los lactatos

En relación a la información bibliográfica disponible sobre la ecotoxicidad, la mayor parte de estudios sobre esta familia se han centrado en la valoración de biodegradabilidad y toxicidad aguda. En la tabla 4.7 se presentan los valores bibliográficos de EC_{50} derivados del trabajo de *Bowmer et al*. en diferentes organismos acuáticos [97].

Tabla 4.7. Valores bibliográficos de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) en diferentes organismos para la familia de los lactatos [97].

Bioensayo	**Lactato de metilo**	**Lactato de etilo**	**Lactato de butilo**
Selenastrum capricornutum (72-96h)	-	2300	329
D. magna (48h)	749	560	320
D. rerio (96h)	-	320	75

Los valores de EC_{50} obtenidos experimentalmente en esta tesis para cada compuesto de esta familia en los bioensayos seleccionados se recogen en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Valores de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) de la familia de los lactatos para los bioensayos de V. fischeri, D. magna y embrión de D. rerio. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media.

Compuesto	**EC_{50}/LC_{50} (mg/L)**		
	V. fischeri	***D. magna***	***D. rerio***
Lactato de metilo	16090 ± 416	1677 ± 201	1066 ± 1,04
Lactato de etilo	3014 ± 37	683 ± 35	410,0 ± 1,23
Lactato de butilo	252 ± 11	322 ± 5	61,70 ± 1,05

Como puede observarse el valor de EC_{50} para el lactato de metilo fue muy superior en comparación con el valor del lactato de butilo, principalmente en bacterias. En todos los ensayos el organismo más sensible fue *D. rerio,* hecho también observado en el estudio de *Bowmer et al.* [97]. El lactato de butilo fue, para todos los organismos analizados, el compuesto más tóxico de esta familia, seguido por el lactato de etilo y, por último, el de metilo. Comparando estos resultados con los mostrados de la bibliografía en la tabla 4.7, se pudieron encontrar ciertas similitudes. Respecto a los resultados obtenidos en *D. magna* a 48 horas de exposición por *Bowmer et al.* [97], los valores para el lactato de etilo (EC_{50} = 560 mg/L) y el de butilo (EC_{50} = 320 mg/L) son similares a los obtenidos experimentalmente, aunque el tiempo de exposición con los disolventes fue diferente. Por el contrario, para el lactato de metilo (EC_{50} = 749 mg/L) la diferencia entre las EC_{50} fue mayor al comparar los resultados de ambos estudios. Este mismo autor realizó ensayos con *D. rerio,* presentando valores de LC_{50} en el lactato de etilo (LC_{50} = 320 mg/L) y butilo (LC_{50} = 75 mg/L) muy similares a los de este trabajo, a pesar de tratarse de un tiempo de exposición mayor (96 horas) [97].

Los valores de EC_{50} y LC_{50} aguda obtenidos experimentalmente mostraron relación con la estructura de los disolventes, de modo que, la ecotoxicidad aguda aumenta al incrementar la longitud de la cadena lateral. Este hecho fue observado anteriormente en la familia de los levulinatos y en otros estudios con líquidos iónicos [154-156] o derivados del glicerol [157-159] e incluso en diferentes organismos, como también demostró *Bowmer et al*. [97].

En este estudio se observa que el valor de EC_{50} en los ésteres alquílicos del ácido láctico en *D. magna* disminuye cuanto mayor es la longitud de la cadena y, de nuevo, los organismos más sensibles serían los peces. [97]

Para continuar con el estudio desde el punto de vista medioambiental sobre la familia de lactatos, el ensayo con *D. rerio* permitió obtener información sobre el posible potencial teratogénico de los mismos. Para ello, se obtuvieron los fenotipos de los embriones vivos tras la exposición a diferentes concentraciones de cada disolvente. A continuación se presentan las imágenes de los fenotipos de embrión de *D. rerio* tras la

exposición al compuesto más tóxico de esta familia para este organismo, el lactato de butilo (figura 4.6)

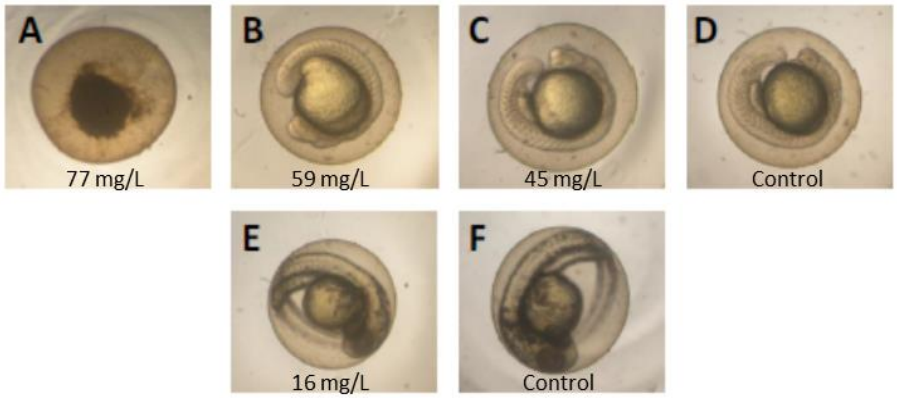


Figura 4.6. Imágenes representativas de los fenotipos de embrión de D. rerio encontrados después de 24 (A-D) o 48 horas (E y F) tras exposición a diferentes concentraciones de lactato de butilo. Imágenes extraídas del informe de resultados de ZF Biolabs.

Tras 24 hpf, a concentraciones de exposición de 77 mg/L se encontraron embriones necróticos (Fig. 4.6.A), a 59 mg/L la mayoría de los embriones se observaron vivos con 18 somitas pero con un desarrollo retrasado (Fig 4.6.B) y a 45 mg/L el fenotipo fue de embrión vivo con 21 somitas (Fig 4.6.C), igual que el encontrado para el control negativo (Fig 4.6.D). A las 48 hpf, no se observaron efectos subletales significativos y a la concentración de 16 mg/L el fenotipo era de embrión vivo (Fig 4.6.E), igual al del control negativo (Fig 4.6.F).

Tras la exposición de embriones a los distintos disolventes de la familia lactato se observó que todos ellos presentaron efectos subletales a diferentes concentraciones por debajo de la LC_{50} obtenida para este biomodelo. En este caso, el lactato de metilo (LC_{50} = 1066 mg/L) dejó de presentar efectos negativos en embriones por debajo de 790 mg/L. El lactato de etilo (LC_{50} = 410 mg/L) presentó efectos teratogénicos a partir de 385 mg/L y el lactato de butilo (LC_{50} = 61,70 mg/L) a partir de 16 mg/L. No obstante, en la familia de los lactatos, los efectos subletales encontrados fueron únicamente vinculados al retraso en el desarrollo embrionario.

3.3 Familia de los furfurales

La información encontrada en la bibliografía respecto a la ecotoxicidad aguda de esta familia de compuestos reveló que el furfural ha sido estudiado más ampliamente que muchos otros disolventes en diferentes especies acuáticas: algas, peces, moluscos y crustáceos [160-163]. Por otro lado, para el alcohol tetrahidrofurfurílico se encontraron valores de rangos de EC_{50} obtenidos del *National Institute of Technology and Evaluation* [164] en varias especies de peces y crustáceos y un valor publicado por *Alabaster et al.* en peces [165]. En el caso del resto de compuestos de esta familia, 5-metilfurfural y alcohol furfurílico, no se encontraron resultados sobre estudios ecotoxicológicos, por lo que no se dispone de datos de EC_{50} o LC_{50} previos.

En la tabla 4.9 se recogen los valores de EC_{50} o LC_{50} encontrados en la bibliografía para el furfural y el alcohol tetrahidrofurfurílico en diferentes organismos acuáticos, siendo para el furfural mucho menores que para el otro disolvente.

Tabla 4.9. Valores de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) para la familia de derivados del furfural [160-163].

Bioensayo	**Furfural**	**Alcohol tetrahidrofurfurílico**
Pseudokircheneriella subcapitata	19,9	>100
D. magna (48h)	-	>92
D. magna (24h)	29	-
Oryzias latipes (96h)	-	>100
Rasbora heteromorpha (48h)	-	3400
Mysidopsis bahia (96h)	10,57	-
Crassostrea virginica (96h)	19	-
Pimephales promela**,** fathead minnow (96h)	20,6	-
Oncorhynchus mykiss (96h)	3,62	-
Lepomis macrochirus (96h)	5,8	-
Cyprinodon variegatus (96h)	14	-
Poecilia reticulata (14d)	10,6	-

En la tabla 4.10 se presentan los resultados experimentales de EC_{50} y LC_{50} obtenidos en los tres bioensayos realizados para cada uno de los compuestos de la familia.

Tabla 4.10. Valores de concentraciones de toxicidad aguda EC_{50}/LC_{50} (mg/L) de la familia de los lactatos para los bioensayos de V. fischeri, D. magna y embrión de D. rerio. Los valores se presentan como media ± error estándar de la media.

Compuesto	**EC_{50}/LC_{50} (mg/L)**		
	V. fischeri	***D. magna***	***D. rerio***
Furfural	454 ± 5	31 ± 1	13,21 ± 1,04
5-Metilfurfural	300 ± 4	20 ± 2	197 ± 1,04
Alcohol Furfurílico	116 ± 9	110 ± 2,34	837,1 ± 5,25
Alcohol Tetrahidrofurfurílico	3379 ± 430	13204 ± 267	12073 ± 1,04

Los resultados mostraron que para esta familia de disolventes la toxicidad es diferente en cada organismo estudiado. En el caso del alcohol furfurílico, el valor obtenido de EC_{50} para *V. fischeri* fue coherente con el valor encontrado por *Ventura et al*. (EC_{50} = 101 mg/L) [96]. El furfural y el 5-metilfurfural resultaron ser disolventes más ecotóxicos para cualquiera de los bioensayos experimentales, a excepción del realizado con la bacteria *V. fischeri*. Además, son notables los bajos valores de EC_{50} obtenidos para ambos compuestos en *D. magna* y para el furfural en *D. rerio*, tal y como se observó previamente en la búsqueda bibliográfica para otras especies de peces (*Onchorynchus mykiss y Lepomis macrochirus)*.

La conclusión obtenida al observar los resultados experimentales, es que el alcohol tetrahidrofurfurílico presenta valores de EC_{50} superiores respecto al resto de disolventes de la familia en los tres organismos estudiados, concordando estos datos experimentales con los bibliográficos de la tabla 4.9. De hecho, se podría confirmar que se trata del compuesto menos ecotóxico de la familia.

La relación entre la ecotoxicidad y la estructura de los disolventes no resultó tan evidente para esta familia. A efectos generales, la baja ecotoxicidad del alcohol

tetrahidrofurfurílico en todos los organismos, podría apuntar a que la desaparición de los dobles enlaces en el ciclo provoque una posible disminución en la ecotoxicidad.

Tras el contacto con diferentes concentraciones de los disolventes de la familia del furfural, se observaron fenotipos de embriones que indicaron posibles riesgos teratogénicos. En la figura 4.7, se presentan las imágenes de los fenotipos de embrión de *D. rerio* al ser expuestos a diferentes concentraciones de furfural, el compuesto con menor LC_{50} obtenida para este biomodelo y, por tanto, más tóxico de la familia.

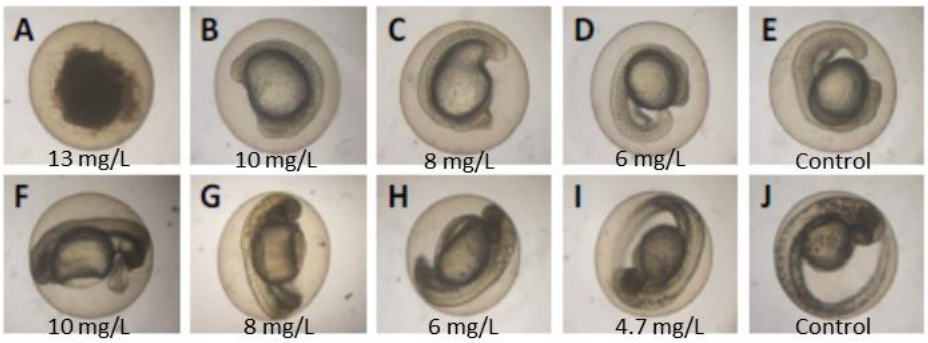


Figura 4.7. Imágenes representativas de los fenotipos de embrión de D. rerio encontrados tras 24 (A-E) o 48 horas (F-G) tras exposición a diferentes concentraciones de furfural. Imágenes obtenidas del informe de resultados de ZFBiolabs.

Tras 24 horas de exposición, se observaron embriones necróticos a 13 mg/L de furfural (Fig. 4.7.A) y embriones que mostraron un retraso en el desarrollo embrionario, mayor conforme se incrementó la dosis (Fig 4.7.B-C). De igual modo, a 48 hpf las malformaciones encontradas a 10 mg/L de furfural (Fig 4.7.F) (malformaciones generalizadas, sin circulación sanguínea y un leve latido cardiaco) fueron mayores que a las exposiciones a 8 y 6 mg/L de furfural (Fig 4.7.G y H), (buena circulación sanguínea, edemas con eritrocitos y pigmentación leve). A concentraciones de 4,7 mg/L el fenotipo encontrado mayoritariamente fue de embrión vivo (Fig 4.7.I) como en el control negativo (Fig 4.7.J).

Cabe destacar, la necesidad de tomar en consideración la observación de efectos subletales con potencia teratogénica ya que, en todos los casos, se observaron por debajo de la LC_{50} obtenida para cada disolvente. Tras los resultados obtenidos, por debajo de concentraciones de 4,7 mg/L de furfural (LC_{50} = 13,21 mg/L) no se esperan

efectos negativos en los embriones, sin embargo, para el 5-metilfurfural (LC_{50} = 197 mg/L) no se encontró ningún embrión sin signos de subletalidad en las concentraciones testadas (9-45 mg/L), a excepción del control negativo. Para los alcoholes de la familia, las concentraciones a las que aparecen estos efectos, fueron considerablemente mayores a los otros dos compuestos anteriormente comentados. De hecho, para el alcohol furfurílico (LC_{50} = 837,1 mg/L) los efectos subletales aparecieron por encima de la concentración de 400 mg/L y para el alcohol tetrahidrofurfurílico (LC_{50} = 12073 mg/L) a partir de 4700 mg/L, destacando la baja toxicidad de este último para *D. rerio*.

3.4 Comparativa de la ecotoxicidad en las tres familias estudiadas y clasificación de los disolventes

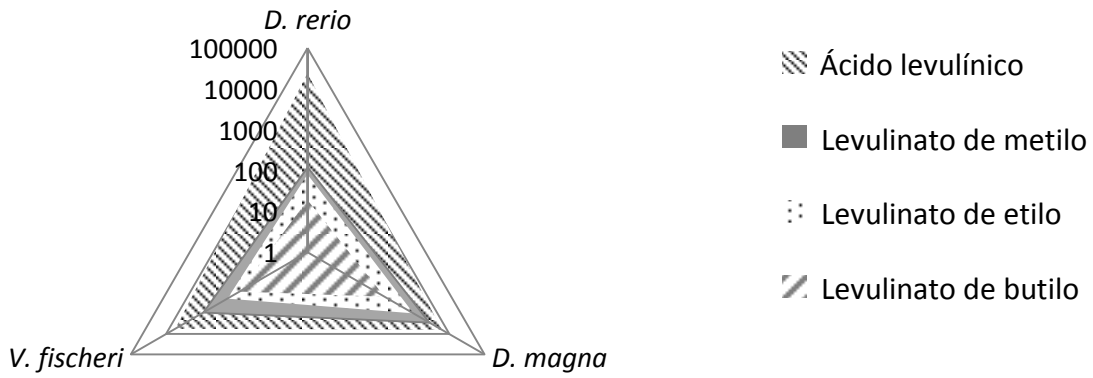
Para recapitular los resultados obtenidos en el estudio de ecotoxicidad realizado en este trabajo, en la figura 4.8 se representa un gráfico radial comparativo de los valores de EC_{50}/LC_{50} obtenidos para cada organismo y compuesto dentro de cada una de las familias seleccionadas.

Tal y como se observa, el organismo más sensible tanto en la familia de los levulinatos como de los lactatos fue el pez *D. rerio*. Sin embargo, para la familia de los furfurales no se pudo asignar un patrón concreto, ya que la sensibilidad es distinta según el compuesto estudiado y el organismo utilizado.

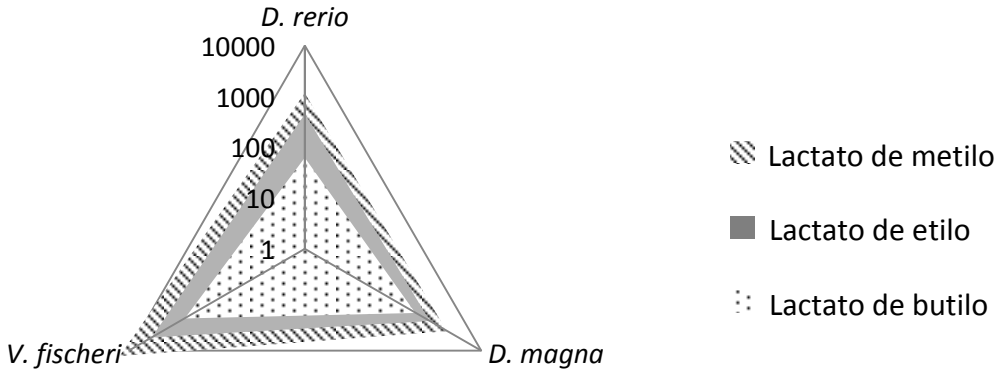
El patrón de ecotoxicidad de los ésteres es el mismo independientemente del organismo estudiado. Por tanto, podría generalizarse que, en organismos acuáticos la toxicidad de un lactato o un levulinato alquílico es mayor cuanto más larga sea su cadena lateral sustituyente. Esta relación ya fue confirmada a través de tres hechos diferentes:

- en el estudio de *Bowmer et al*. [97] con lactatos alquílicos en *D.magna,*
- en el estudio realizado por *Lomba et al*. [151] con la familia de los levulinatos,
- en la valoración ecotoxicológica experimental de las familias de los levulinatos y lactatos realizada en esta tesis doctoral.

Familia de los levulinatos



Familia de los lactatos



Familia de los furfurales

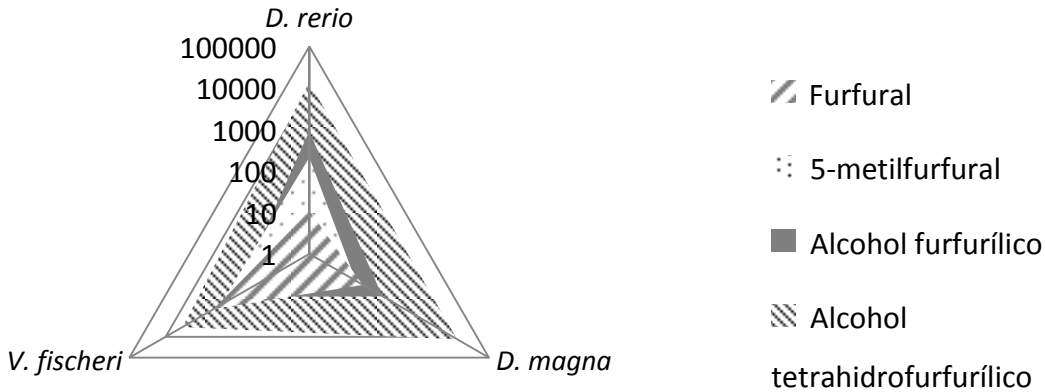


Figura 4.8. Representación del punto final (EC_{50}/LC_{50} en mg/L) para cada biomodelo acuático estudiado en las familias de disolventes.

A pesar de que la tendencia observada en la toxicidad de los lactatos alquílicos fue la misma que en los levulinatos alquílicos, se debe destacar que los valores de EC_{50} en *V. fischeri* y *D. rerio* para los lactatos son más elevados, por lo que su ecotoxicidad es menor. De igual manera, los efectos subletales encontrados para esta familia fueron más leves que los encontrados para la familia de los levulinatos y furfurales.

Tal y como se observa en la figura 4.8, para la familia de los furfurales no fue posible establecer una relación clara de la ecotoxicidad observada con la estructura de los compuestos, a excepción de que la ausencia de dobles enlaces en el anillo disminuye la ecotoxicidad. No obstante, será necesario realizar más estudios para poder establecer dicha relación.

Finalmente, analizando los efectos teratogénicos observados en el ensayo de toxicidad aguda en embriones de *D. rerio*, la familia de los lactatos parece presentar efectos únicamente relacionados con la pigmentación y desarrollo ralentizado. Sin embargo, los efectos encontrados para las familias de los levulinatos y los furfurales se encuentran relacionados con la disminución de circulación sanguínea, presencia de eritrocitos, formación de edemas y otras malformaciones generalizadas. Es por ello, que podría decirse que los efectos causados por la familia de los lactatos parecen menos severos que los ocasionados por las otras dos familias de compuestos.

En la figura A1, A2 y A3 del apartado de Anexos I se presentan fotos de los fenotipos de los embriones de *D. rerio* observados al exponerse a diferentes concentraciones de todos los disolventes ensayados durante 24 y 48 horas.

Con todos los datos de EC_{50}/LC_{50} obtenidos a lo largo de esta evaluación de ecotoxicidad, se clasificó cada uno de los compuestos bajo estudio por su nivel de toxicidad acuática para cada biomodelo utilizado, haciendo uso de la clasificación de Passino y Smith [73]. En la figura 4.9, se muestra un gráfico para cada organismo acuático donde se puede observar la clasificación de los disolventes de la biomasa.

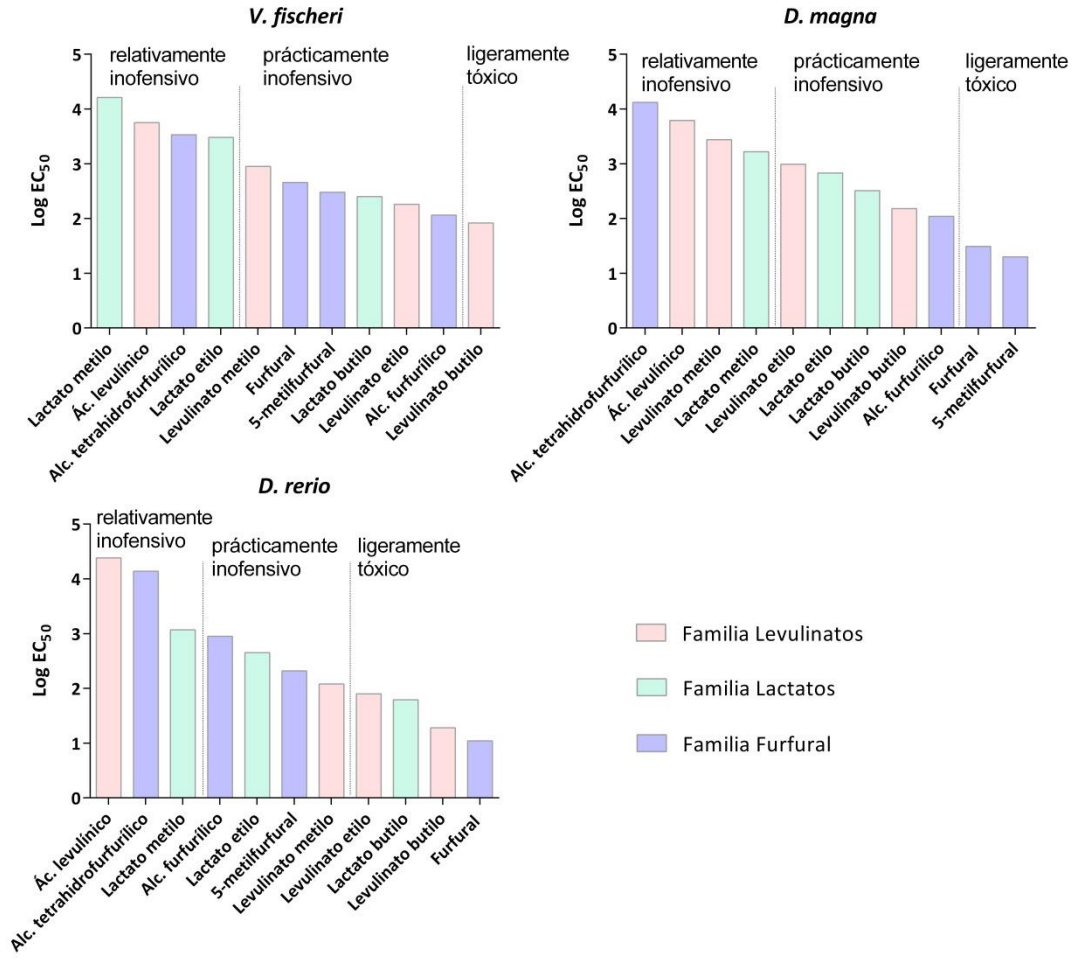


Figura 4.9. Representación gráfica los valores de Log EC_{50} de cada disolvente en V. fischeri, D. magna y D. rerio y su clasificación de toxicidad acuática según Passino y Smith.

Atendiendo a la representación gráfica de la toxicidad aguda en *V. fischeri* en la figura 4.9, todos los compuestos estudiados pueden clasificarse como no tóxicos o prácticamente inofensivos, a excepción del levulinato de butilo que presentó el valor más bajo, 83 mg/L. Por otro lado, el lactato de metilo resultó ser el compuesto de los estudiados menos tóxico para bacteria y es relativamente inofensivo. Para el organismo *D. magna* (figura 4.9) existen dos compuestos ligeramente tóxicos que presentan un valor de EC_{50} inferior a 100 mg/L: el furfural y el 5-metilfurfural. Sin embargo, el alcohol tetrahidrofurfurílico, el ácido levulínico, el levulinato de metilo y el lactato de metilo se clasifican como relativamente inofensivos. Y para *D. rerio*, se observa que la toxicidad aumenta con respecto a los otros organismos anteriormente

analizados (figura 4.9). Por tanto, como ya se mencionó con anterioridad, este vertebrado inferior podría ser la especie más sensible de las tres seleccionadas. El lactato de butilo y el levulinato de etilo pasan a presentar una ligera toxicidad, hecho que no se había observado en bacteria ni crustáceo. El levulinato de butilo y el furfural se suman a los dos anteriores por presentar también una ligera toxicidad para este organismo. Por otro lado, el alcohol tetrahidrofurfurílico, el ácido levulínico y el lactato de metilo se presentan como relativamente inofensivos para peces.

Teniendo en cuenta todo ello, el alcohol tetrahidrofurfurílico, el ácido levulínico y el lactato de metilo serían los compuestos que pueden considerarse relativamente inofensivos para los tres organismos acuáticos estudiados.

4. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

En esta tesis se realizó una valoración de los efectos citotóxicos, neurotóxicos y genotóxicos de los compuestos químicos seleccionados permitiendo hacer un estudio inicial de su toxicidad y cuyos resultados se desarrollan a continuación. De este modo, se alcanza el objetivo 4 “Realizar una evaluación de la toxicidad de los disolventes”.

Los organismos multicelulares reaccionan a nivel celular fundamentalmente ante los cambios ambientales. El uso de biomarcadores en la toxicología humana tiene como principales objetivos medir la exposición a agentes xenobióticos y predecir su respuesta en la salud humana. Es posible realizar medidas *in vitro* para obtener información sobre dichas respuestas de modo que se minimicen los ensayos con organismos vivos. La bibliografía muestra resultados previos de los compuestos en diferentes pruebas de toxicidad.

Tal y como se mencionó en el capítulo de material y métodos, se seleccionaron los siguientes ensayos:

- Evaluación del perfil neurotóxico: ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).
- Evaluación de la toxicidad celular:
  - ✓ Ensayo de citotoxicidad celular: reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).
  - ✓ Estudio de proliferación celular: ensayo de Bradford.
  - ✓ Estudio de la morfología celular
    - Microscopía óptica de contraste de fase: Análisis morfológico *in vivo*
    - Microscopía de fluorescencia: Visualización de lípidos
  - ✓ Análisis de la genotoxicidad: visualización de la fragmentación de ADN celular.

Estos bioensayos permiten predecir el comportamiento de los disolventes sobre la toxicidad y por tanto, evaluar si pueden ser perjudiciales para la salud humana. Por un lado, la AChE es uno de los principales biomarcadores de efecto en el sistema nervioso para la evaluación de exposición a contaminantes, además de disponer de una elevada sensibilidad [166]. Esta enzima inicialmente era utilizada como biomarcador para evaluación en la toxicidad de pesticidas, sin embargo se ha demostrado que la enzima también puede ser inhibida por otras sustancias químicas [42].

Por otro lado, dentro de la amplia variedad de sistemas experimentales existentes para valorar los efectos derivados de la exposición a productos químicos, los cultivos celulares constituyen un buen modelo *in vitro* de predicción de toxicidad en humanos [54, 55]. El ensayo de reducción del MTT se trata de un protocolo de citotoxicidad basal fundamental para establecer el perfil de los compuestos químicos, incluyendo los efectos dependientes de dosis y predecir la toxicidad sistémica aguda *in vivo* [54].

A continuación, se presenta para cada familia los resultados obtenidos y su discusión, así como resultados bibliográficos encontrados.

4.1 Familia de los levulinatos

Evaluación del perfil tóxico de la familia de levulinatos

Para realizar la evaluación toxicológica de estos compuestos se determinó la citotoxicidad basal (a través del ensayo de reducción del MTT a 24 horas de exposición) sobre tres líneas celulares (Cos-7, A375 y HaCaT) con el fin de obtener el valor de IC_{50} para cada compuesto. Del mismo modo, se realizaron medidas de la inhibición de la enzima AChE para conocer los posibles efectos neurotóxicos de cada compuesto.

En la figura 4.10 se muestran las gráficas en las que se representa el porcentaje de viabilidad celular a 24 horas de exposición con cada dosis de disolvente probada para las tres líneas celulares.

En dicha figura se observa que todos los disolventes mostraron un efecto dosis dependiente en el porcentaje de viabilidad celular en las tres líneas, sin mostrar efectos negativos sobre las mitocondrias de las mismas. Por ello, se sugiere que esta familia de disolventes no ejerce daño oxidativo, incluso a dosis elevadas de los mismos. No obstante, existen algunos estudios que indican que los ácidos débiles pueden afectar a la cadena respiratoria mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produciendo estrés oxidativo [167]. De hecho, en otros estudios se obtuvo que el ácido levulínico (a concentraciones experimentales de 95, 250 y 400 mM) puede producir un ligero estrés oxidativo en esa levadura en condiciones bajas de glucosa, generando mayor nivel de oxidación intracelular cuanto mayor es la concentración de exposición al ácido [168]. Además, debe tenerse en cuenta que un medio ácido puede provocar daños en el funcionamiento de los cultivos celulares por un cambio de pH.

De las tres líneas probadas la más sensible a todos los disolventes fue la línea celular HaCaT, presentando diferencias significativas incluso a la dosis de 500 mg/L con el levulinato de etilo.

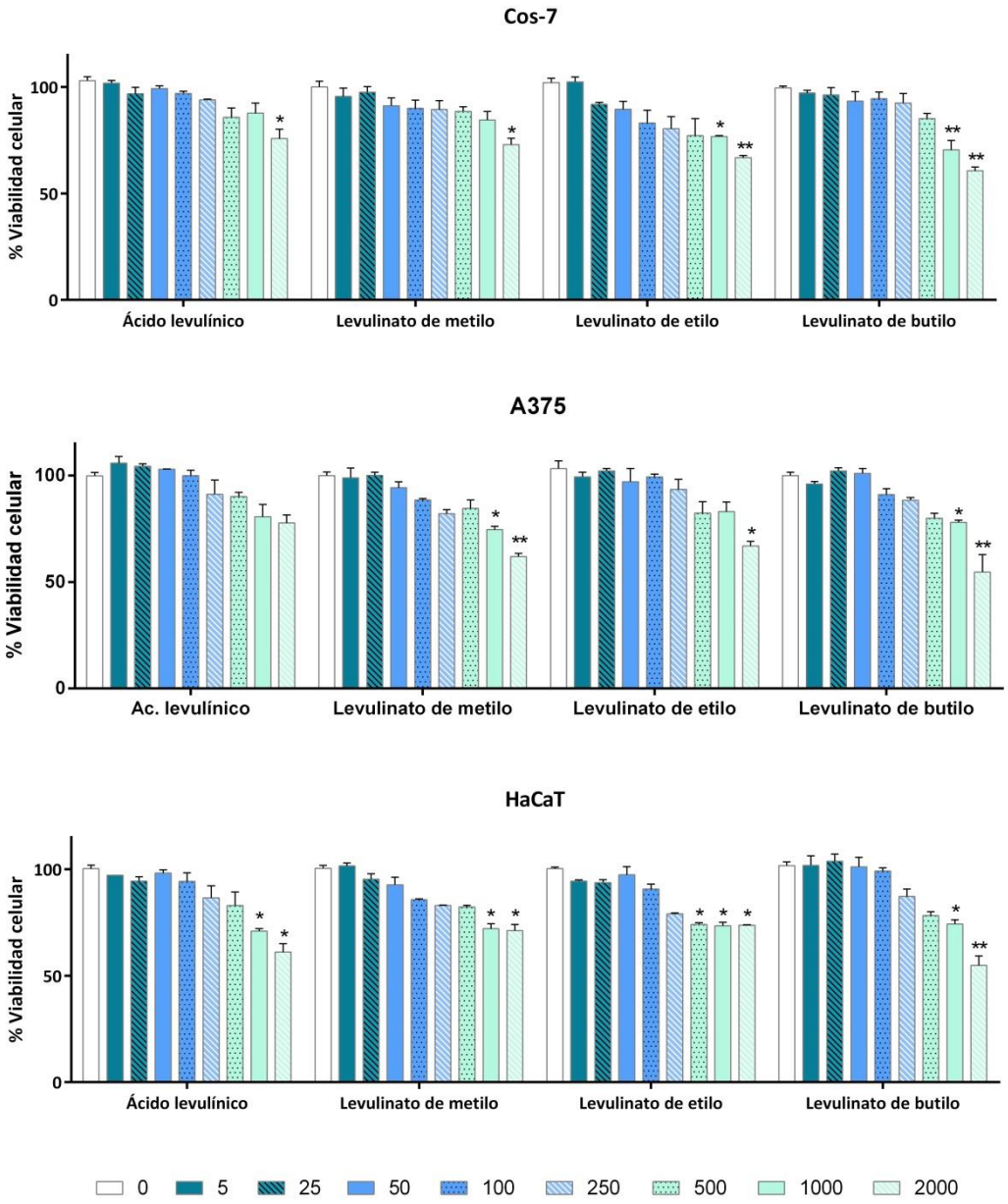


*Figura 4.10. Representación del porcentaje de viabilidad celular obtenida en líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de los compuestos de la familia de los levulinatos. Se representan los valores medios ± el error estándar de la media, obtenidos para el ensayo MTT. Diferencias significativas respecto al control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.*

A continuación, la tabla 4.11 recoge los datos experimentales de la dosis de compuesto que produjeron la muerte de la mitad de la población celular, IC_{50}, para cada disolvente en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT. Estos datos se obtuvieron

por extrapolación al encontrarse la IC_{50} por encima de la máxima concentración testada.

Tabla 4.11. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos en la familia de los levulinatos para el ensayo de reducción del MTT en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT y el ensayo de inhibición de AChE. Los datos se representan como media ± error estándar de la media.

IC_{50} (mg/L)	**Ácido levulínico**	**Levulinato de metilo**	**Levulinato de etilo**	**Levulinato de butilo**
MTT (Cos-7)	6024 ± 725,0	5229 ± 769,2	2803 ± 495,1	2630 ± 257,1
MTT (A375)	5658 ± 771,0	2729 ± 266,0	3963 ± 489,2	2578 ± 279,5
MTT (HaCaT)	2572 ± 262,4	2891 ± 394,4	2770 ± 434,5	2416 ± 201,8
AChE	2271 ± 51,0	6820 ± 900,5	4049 ± 302,0	2979 ± 634,7

Realizando una comparativa de todos los resultados de citotoxicidad basal de esta familia de disolventes, el compuesto que produjo mayor daño fue el levulinato de butilo en las tres líneas celulares. Los valores obtenidos experimentalmente para este compuesto difirieron de los obtenidos por *Ferrer et al.* (IC_{50} = 5700 mg/L) mediante el ensayo de captación de rojo neutro, método que mide la viabilidad de las células mediante su capacidad para retener el reactivo en su interior [169]. No obstante, en ambos casos se puede decir que este compuesto presentó baja citotoxicidad.

La baja citotoxicidad del levulinato de etilo observada en los resultados experimentales concuerda con otro estudio que determinó su escasa toxicidad de nuevo con el ensayo de captación del rojo neutro [170]. Otros estudios con ésteres de levulinato, en concreto de colina y betaina, mostraron no causar efectos significativos de citotoxicidad a dosis de 1000 mg/L [95]. De hecho, esta baja citotoxicidad del anión levulinato hace que se esté utilizando como estructura de síntesis de líquidos iónicos, los cuales son considerados también disolventes verdes [95].

Atendiendo al ensayo para determinación de neurotoxicidad (resultados de IC_{50} presentados en tabla 4.11), se considera que ninguno de los compuestos de esta familia tuvo actividad enzimática inhibidora de la AChE, siendo el ácido levulínico el compuesto con mayor perfil neurotóxico de esta familia. Debe considerarse que el

valor de IC_{50} aportado en la tabla 4.11 para el levulinato de butilo en el ensayo de inhibición de la AChE fue estimado, ya que la máxima concentración testada fue de 2000 mg/L por ser el límite de solubilidad en el tampón correspondiente a utilizar en el ensayo. Por todo ello, los resultados obtenidos en este ensayo apuntaron a que la exposición a esta familia de compuestos no genera procesos neuronales adversos.

Por otro lado, se observó que existe cierta relación entre la estructura de cada disolvente y su capacidad de generar toxicidad, siendo esta mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena lateral. Esta tendencia en los valores de IC_{50} de los ésteres de ácido levulínico fue la misma tanto para el ensayo del MTT como para el de AChE. Esta relación estructural ha sido observada también en ciertos líquidos iónicos de imidazol, concretamente evaluando el efecto de sustituyentes alquílicos en la inhibición de la enzima AChE [42].

Observación de efectos de toxicidad tras el contacto con los disolventes

De forma paralela a los ensayos de citotoxicidad, se llevaron a cabo varios estudios del efecto tras 24 horas de contacto con una concentración de 2000 mg/L de cada uno de los compuestos de la familia levulinato en las tres líneas celulares. Estos estudios fueron: cuantificación de proteína celular total, morfología *in vivo*, captación de lípidos y fragmentación de ADN.

Para determinar si los cambios observados a nivel de metabolismo celular estaban realmente asociados a una baja viabilidad de estas células, se procedió a cuantificar la proteína celular total (CPT) a 2000 mg/L para cada compuesto en cada línea celular a través del ensayo de Bradford. Este ensayo es un indicador directo del porcentaje de células vivas en el pocillo tras el contacto con el disolvente. Estos datos se compararon con los valores de viabilidad celular obtenidos a la misma concentración de compuesto en el ensayo del MTT y se representan en la tabla 4.12. Ambos ensayos dieron resultados similares, lo que sugiere una disminución en el número de células del cultivo en las tres líneas celulares debido al contacto de los

disolventes, manteniéndose la relación estructura-toxicidad para las líneas Cos-7 y HaCaT.

Tabla 4.12. Valores de porcentaje de viabilidad celular y CPT a 2000 mg/L en cada línea celular para la familia de los levulinatos. Los datos son presentados como la media ± el error estándar de la misma.

	%	Ácido levulínico	Levulinato de metilo	Levulinato de etilo	Levulinato de butilo
Cos-7	**Viabilidad celular**	75,91 ± 7,54	74,36 ± 4,19	66,73 ± 1,93	60,58 ± 2,44
	CPT	30,43 ± 1,97	81,04 ± 4,40	76,26 ± 1,73	75,71 ± 3,99
A375	**Viabilidad celular**	77,75 ± 6,44	61,91 ± 2,48	66,98 ± 3,63	64,83 ± 1,20
	CPT	97,33 ± 1,34	83,03 ± 3,55	78,16 ± 4,92	82,10 ± 1,83
HaCaT	**Viabilidad celular**	61,09 ± 5,62	71,12 ± 4,21	73,7 ± 0,31	54,89 ± 7,59
	CPT	79,83 ± 13,75	85, 91 ± 1,24	86,11 ± 0,80	79,10 ± 3,25

Como puede observarse, en el ensayo de Bradford se obtuvieron valores por encima del 70% de proteína total respecto del control en todos los disolventes y líneas celulares, a excepción del valor obtenido para el ácido levulínico en las células Cos-7. Este hecho podría indicar un efecto negativo del medio ácido sobre esta línea celular. Aunque la mayor parte de las células son tolerantes a un medio ácido en términos de supervivencia, el cambio de medio de su entorno puede modificar su capacidad de proliferación celular y sus propiedades metabólicas [171]. Tal y como se mencionó anteriormente, el levulinato de butilo presentó mayor citotoxicidad siendo destacable que la concentración de 2000 mg/L del mismo resultó ligeramente citotóxica (viabilidad celular <60%) después de 24 horas de contacto para la línea celular HaCaT.

Adicionalmente, se estudió la morfología de cada línea celular, en condiciones basales (control) y tras su incubación durante 24 horas con los disolventes a la máxima concentración ensayada (2000 mg/L), mediante la observación de células vivas con un microscopio invertido de contraste de fases (CF) y la emisión de fluorescencia al teñir las células con rojo Nilo (RN). La figura 4.11 muestra la morfología de las células antes

de la adición del disolvente y tras la exposición con el disolvente más tóxico, que en este caso fue el levulinato de butilo en las tres líneas celulares.

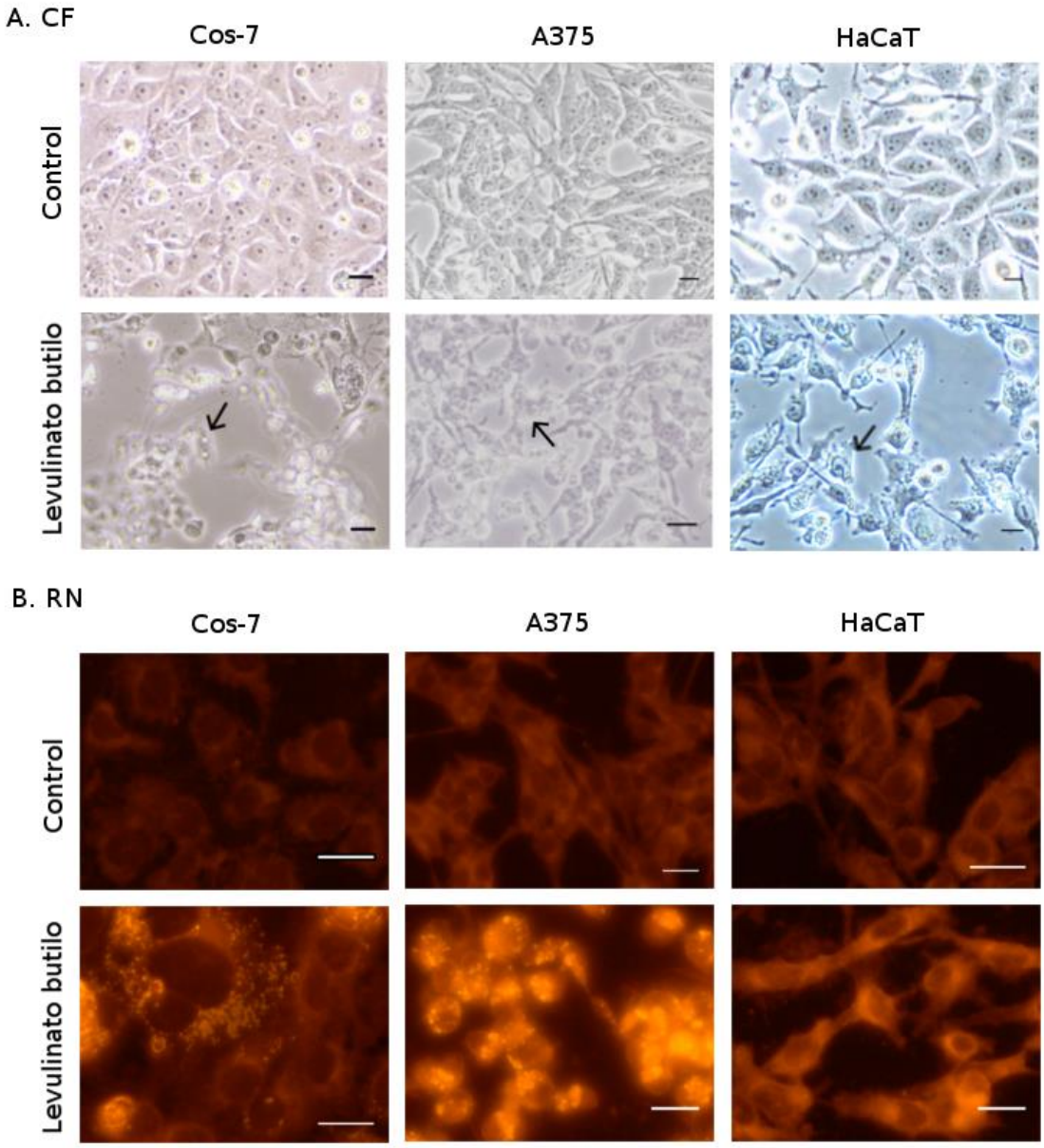


Figura 4.11. Imágenes de los cultivos celulares Cos-7, HaCaT y A375 en condiciones basales y tras exposición durante 24 horas a 2000 mg/L de levulinato de butilo.
A. Microscopía de contraste de fase. B. Microscopía de fluorescencia con tinción con rojo nilo. La escala hace referencia a 20 µm.

Como se observa en las imágenes tomadas con CF y representadas en la figura 4.11-A (imágenes de control), las células Cos-7 en condiciones basales mostraron una morfología fibroblástica con forma elongada aplanada y triangular al encontrarse aisladas, pero con tendencia aproximadamente esférica cuando se adhirieron a otras células. Normalmente, estas células tienden a encontrase unidas formando una malla fibroblástica característica y generando un bordeado ligero cóncavo [78]. Las células A375 presentaron una morfología epitelial poligonal plana, con un crecimiento rápido en monocapa y tendencia a crecimiento en colonias agrupadas. Y, por último, las células HaCaT, mostraron una morfología poligonal, aunque cuando no se encuentran agrupadas, su morfología es más alargada; no obstante, estas células en cultivo crecen agrupadas en monocapas homogéneas. Esta línea celular conserva la gran mayoría de las características de queratinocitos humanos primarios [79].

La exposición al levulinato de butilo durante 24 horas sobre las células Cos-7, A375 y HaCaT evidenció una inducción de cambios morfológicos en las tres líneas celulares. Se observó una alteración en el crecimiento en monocapa celular y una disminución en la densidad celular en comparación con el control, siendo más acusada en la línea HaCaT, la línea más sensible en el ensayo MTT para esta familia de disolventes, tal y como se muestra en las imágenes de CF (Figura 4.11-A).

Estos cambios morfológicos celulares fueron observados en otros estudios al exponer disolventes previsiblemente verdes, como son algunos DESs de colina, en células CCO a 72 horas [171] o como algunos líquidos iónicos en células de insecto *Sf-9* a 12, 24 y 72 horas, asociando los cambios morfológicos obtenidos a procesos de apoptosis [172]. Además, el levulinato de butilo generó la presencia de unas vesículas refringentes en el citoplasma de las células (flechas indicadas en la figura 4.11-A en imagen CF).

Con el objetivo de determinar si esas vesículas eran debidas a un cúmulo lipídico como consecuencia de un estrés ante la exposición al tóxico, se realizó una tinción con RN. Este colorante, que en condiciones normales proporciona un marcaje rojo difuso, en ambientes ricos en lípidos se acumula y emite una fluorescencia

característica de color amarillo-oro, lo que permite identificar estas estructuras. El marcaje con RN (Figura 4.11-B) mostró pequeños cuerpos amarillo-oro distribuidos por todo el citoplasma en todas las células tratadas con el levulinato de butilo. Estos cuerpos, en la mayoría de los casos, estaban agrupados alrededor del núcleo no fluorescente. Esto nos indicaría que dicha exposición al disolvente da lugar a la aparición de gotas lipídicas, las cuales presentan un patrón similar a las vesículas refringentes que se observaron en el CF.

En línea a estos resultados existen otros estudios con aparición de estas gotas lipídicas ante la exposición a un agente externo, en este caso un contaminante emergente, el di-(2-etilhexil)ftalato (100 µM) a 24 horas en células mamíferas Vero y HaCaT [173], vinculándose este estrés celular más concretamente al retículo endoplasmático [174]. La generación de este tipo de gotas lipídicas también se relacionó en otro estudio con citotoxicidad en *Saccaromyces cerevisiae* expuesto a 50 µM de cadmio durante 48h [175].

Tras la extracción de ADN de las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT en contacto durante 24 horas con 2000 mg/L de cada uno de los compuestos de la familia levulinato, se realizó una electroforesis para observar posibles indicios de genotoxicidad. Para ello, se hizo una comparación de los patrones de bandas obtenidos con los controles negativo y positivo (H_2O_2 0,1 %) de cada línea celular.

La electroforesis no reveló diferencias significativas entre los patrones de bandas obtenidos con los cuatro compuestos y el control negativo en las líneas Cos-7 y HaCaT. Sin embargo, como puede verse en la figura 4.12, en la línea A375 el levulinato de etilo presentó un patrón *smer* similar al obtenido en el control positivo, lo que apunta a un posible efecto genotóxico de este compuesto en dicha línea celular.

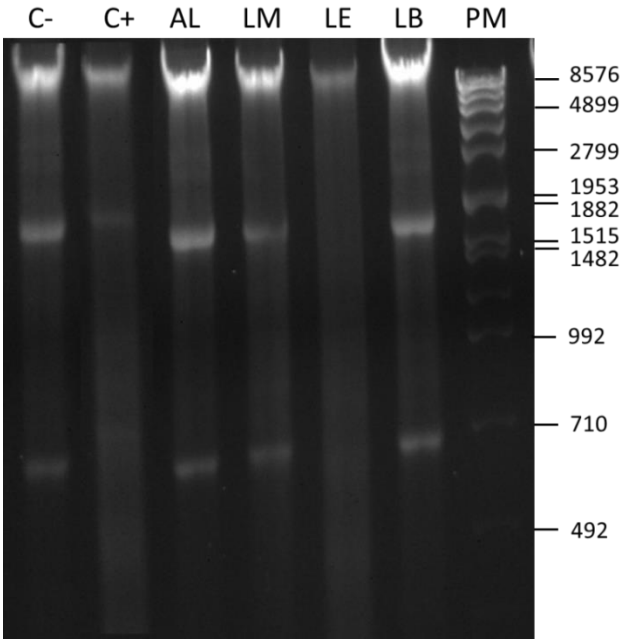


Figura 4.12. Imagen de electroforesis de ADN de células A375 tras 24 horas de exposición a 2000 mg/L de cada compuesto de la familia de los levulinatos en gel de agarosa (1,2%) teñido con Gel-Red (Biotium®). C- control negativo; C+ control positivo; AL ácido levulínico; LM levulinato de metilo; LE levulinato de etilo; LB levulinato de butilo; PM marcador de Peso Molecular.

La ausencia de genotoxicidad de esta familia en las células es coherente con la no mutagenicidad observada en el test de Ames por *Ferrer et al*. [169] para varios ésteres alquílicos del ácido levulínico, entre ellos el de butilo. Por otro lado, existen datos en los que la exposición al ácido levulínico generó modificaciones en la expresión génica de la bacteria *Escherichia coli* [176]. No obstante, sería conveniente estudiar la fragmentación del ADN celular a tiempos de exposición mayores de 24 horas para confirmar la ausencia de daño por parte de los disolventes.

4.2 Familia de los lactatos

Evaluación del perfil tóxico de la familia de lactatos

La figura 4.13 representa el porcentaje de viabilidad celular tras 24 horas de la exposición con concentraciones crecientes de cada uno de los disolventes en las líneas celulares de la tesis.

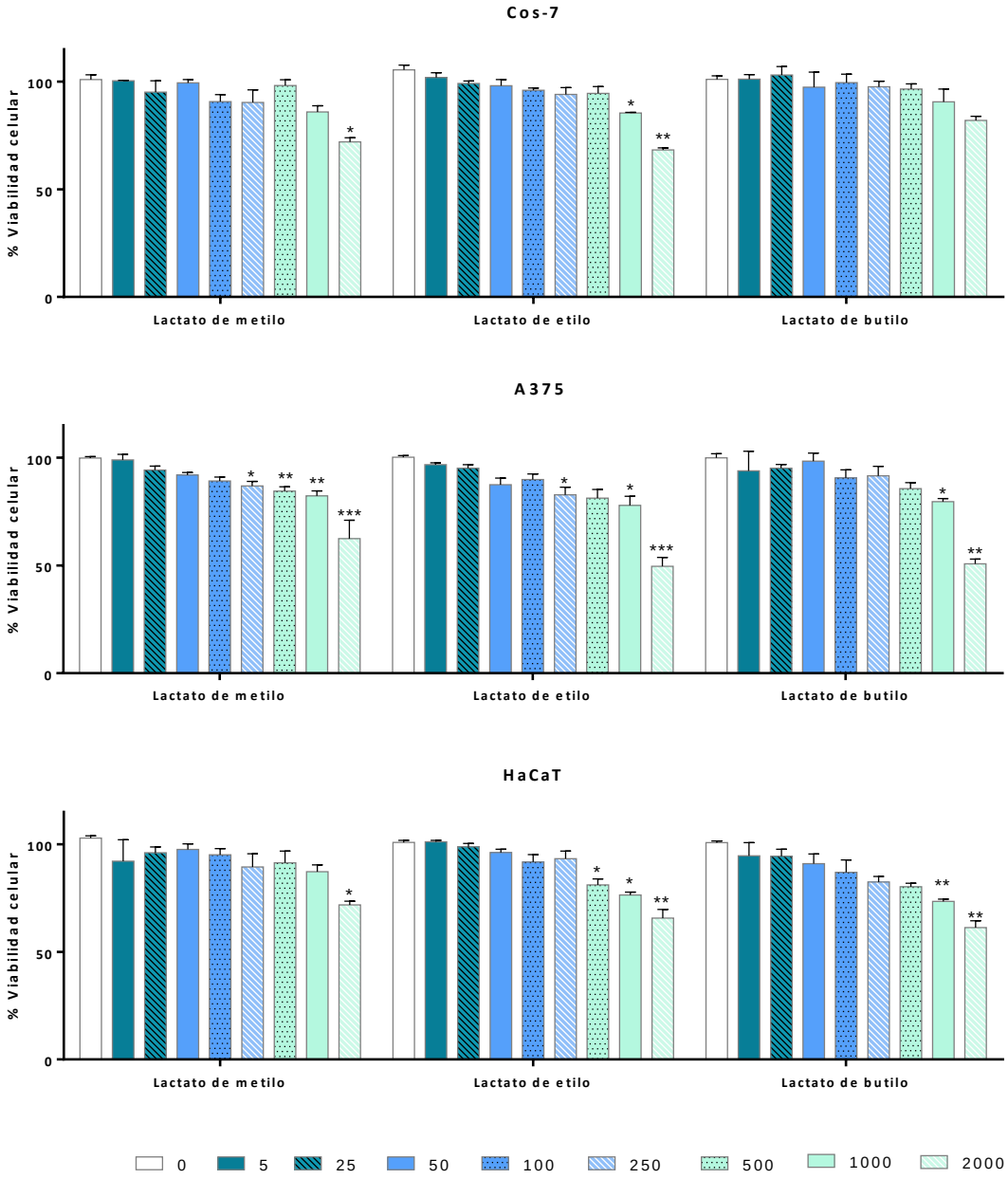


*Figura 4.13. Representación de la citotoxicidad basal obtenida en líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de los compuestos de la familia de los lactatos. Se representan los valores medios ± el error estándar de la media, obtenidos para el ensayo MTT. Diferencias significativas respecto al control: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** P < 0.001.*

Se puede observar como todos los disolventes tienen un efecto dosis dependiente en la citotoxicidad celular. La línea celular Cos-7, es la línea que presentó una mayor resistencia a los compuestos incluso a dosis elevadas. Además, para todas

las líneas celulares se observó que existen diferencias significativas con respecto el control a las concentraciones más elevadas probadas de disolventes.

A continuación, en la tabla 4.13, se presentan los resultados experimentales obtenidos en los ensayos del MTT y AChE.

Tabla 4.13. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos en la familia de los lactatos para el ensayo de inhibición de AChE y el ensayo MTT en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT. Los datos se representan como media ± error estándar de la media.

IC_{50} (mg/L)	**Lactato de metilo**	**Lactato de etilo**	**Lactato de butilo**
MTT (Cos-7)	5217 ± 682,2	4353 ± 383,4	13067 ± 3174
MTT (A375)	3294 ± 358,4	2121 ± 248,9	2699 ± 310,8
MTT (HaCaT)	5265 ± 917,4	3235 ± 272,1	2306 ± 275,7
AChE	15891 ± 2269,4	7458 ± 638,3	5510 ± 489,8

Respecto a la determinación de la citotoxicidad basal a través del ensayo del MTT, los valores de IC_{50} obtenidos variaron en función de cada línea celular. En ninguno de los ensayos realizados se alcanzó el valor de IC_{50} experimentalmente, indicando que la citotoxicidad de esta familia fue baja. Estos resultados son coherentes con la baja citotoxicidad encontrada por *Clary et al.* para los mismos compuestos [94]. En este caso la medida de proliferación que realizó este autor se basó en el recuento de número de células/cm marcadas positivamente con bromodesoxiuridina (BrdU) comparadas con un control, observando una mínima reducción para los lactatos de metilo, etilo y butilo. Además, también demostró ausencia de toxicidad oral en ratas (LD_{50} > 2000 mg/Kg) para los tres disolventes [94]. Sin embargo, en este mismo estudio se observó irritación ocular y dérmica para todos los ésteres de lactato estudiados a excepción del lactato de metilo, probablemente debida a la hidrólisis de los ésteres que produce ácido láctico [177]. Esto se correlaciona con los resultados experimentales mostrados en la tabla 4.14 donde se observa que el lactato de metilo es el compuesto que mostró menor toxicidad por sus altos valores de IC_{50}.

Teniendo en cuenta los valores de IC_{50} obtenidos en el ensayo de inhibición de la AChE (tabla 4.13), puede decirse que los compuestos de esta familia no tendrían efectos adversos en procesos neuronales. Es importante mencionar que el valor de IC_{50} del lactato de metilo fue un valor estimado por extrapolación. Estos resultados concuerdan con un estudio que sugirió ausencia de neurotoxicidad de los ésteres de lactato, principalmente debida al proceso de hidrólisis que sufren en el organismo por actividad de la enzima esterasa formando ácido láctico y alcoholes alifáticos [178]. En el caso de los lactatos estudiados en esta tesis, los metabolitos a considerar serían el metanol, etanol y butanol. Sin embargo, este trabajo mostró que la inhalación de metanol (20000 mg/m^3), etanol (15200 mg/m^3) y n-butanol (20000 mg/m^3) no generaron problemas en el sistema nervioso de roedores [178].

Atendiendo a la relación entre toxicidad y estructura, únicamente se observó un incremento de la toxicidad conforme aumentaba el tamaño de la cadena lateral sustituyente en la línea HaCaT. Siguiendo la misma línea de estos resultados, en el estudio de *Clary et al*. [94] se obtuvo que la citotoxicidad es mayor cuanto mayor lo es el peso molecular de varios ésteres de lactatos. Para el ensayo de inhibición de la AChE se demostró una relación entre toxicidad y la longitud de la cadena sustituyente en los compuestos estudiados. Así, la toxicidad aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena. Hecho que como se mencionó anteriormente, también se observó en algunos líquidos iónicos [42].

Observación de efectos de toxicidad tras el contacto con los disolventes

Con el fin de conocer otros efectos de toxicidad producidos por los disolventes de la familia de los lactatos, se realizaron diferentes estudios cuyos resultados se muestran a continuación.

La tabla 4.14 presenta los porcentajes de viabilidad celular y la cuantificación de proteína total obtenidos experimentalmente para cada compuesto de la familia, ensayado a 2000 mg/L, en cada una de las líneas celulares.

Tabla 4.14. *Valores de porcentaje de viabilidad celular y CPT a 2000 mg/L en cada línea celular para la familia de lactatos. Los datos son presentados como la media ± el error estándar de la misma*.

	%	Lactato de metilo	Lactato de etilo	Lactato de butilo
Cos-7	**Viabilidad celular**	72,05 ± 1,88	64,91 ± 3,50	81,99 ± 1,91
	CPT	102,70 ± 8,81	100,9 ± 1,49	101,1 ± 3,34
A375	**Viabilidad celular**	71,15 ± 1,81	49,63 ± 4,09	50,74 ± 2,15
	CPT	82,08 ± 0,57	93,97 ± 2,25	93,59 ± 0,79
HaCaT	**Viabilidad celular**	71,82 ± 1,70	65,72 ± 3,99	61,25 ± 3,17
	CPT	94,31 ± 3,33	95,52 ± 0,23	89,42 ± 4,85

Para los tres disolventes los valores obtenidos de CPT fueron elevados (> 80%), evidenciando un descenso poco acusado en el número de células del cultivo cuando fueron expuestos a los diferentes compuestos durante 24 horas. Los resultados de viabilidad y CPT para la línea Cos-7 confirmaron que se trata de la línea celular más resistente a la exposición de los lactatos. Igualmente, en la tabla 4.14 se observa que el lactato de etilo y el lactato de butilo presentaron una ligera citotoxicidad mayor.

Con el fin de comprobar daños que los disolventes pueden generar en los distintos cultivos, se realizó un estudio de los cambios de morfología celular tras la exposición a 2000 mg/L de los compuestos durante 24 horas.

En la figura 4.14 se muestran las imágenes de las situaciones basales en cada línea celular y tras el contacto con el lactato de etilo, uno de los compuestos de la familia que se encontró con mayor citotoxicidad. Estas imágenes fueron tomadas por microscopía invertida de CF y por emisión de fluorescencia tras la tinción de las células con RN.

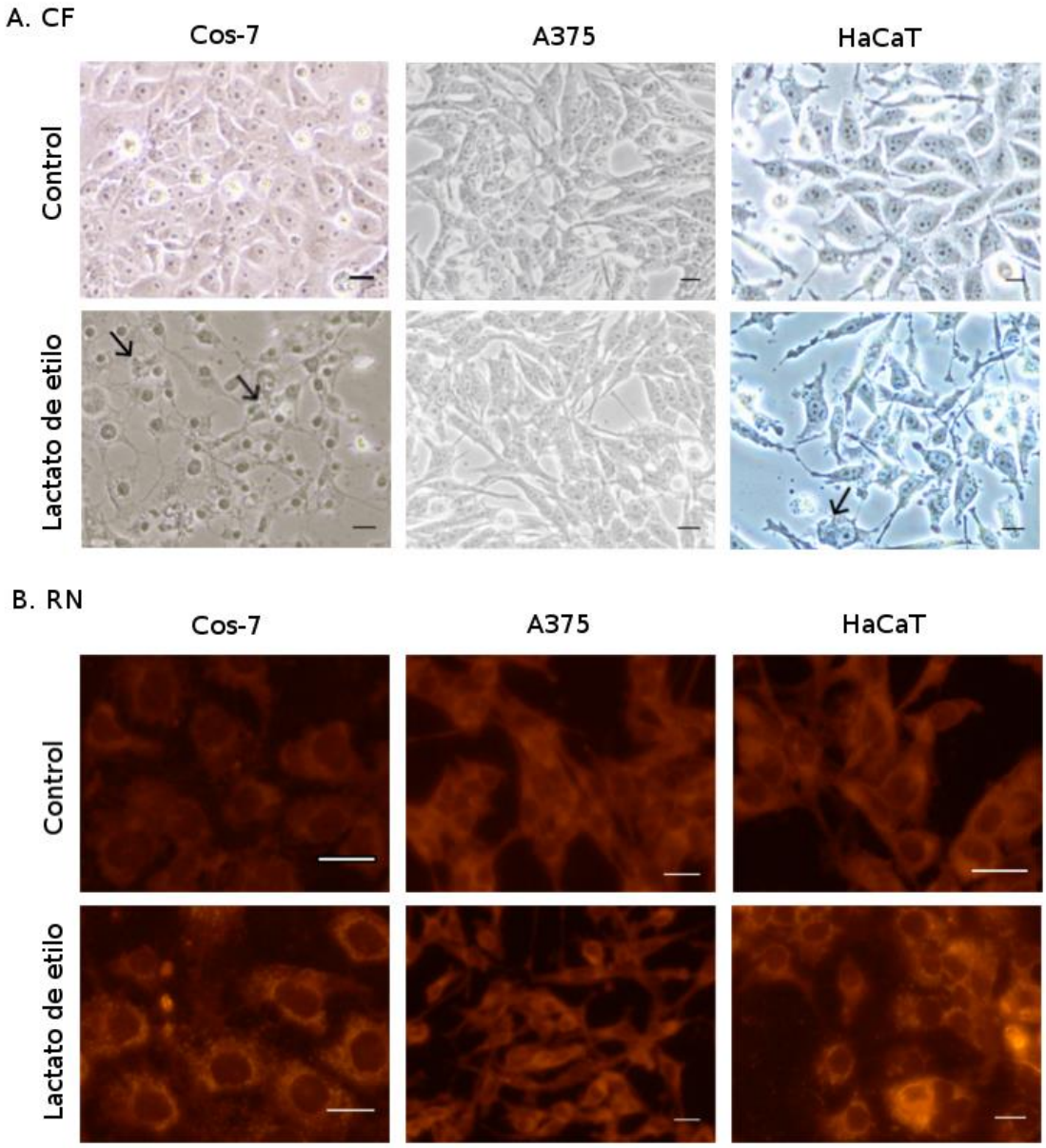


Figura 4.14. Imágenes de los cultivos celulares Cos-7, HaCaT y A375 en condiciones basales y tras exposición durante 24 horas a 2000 mg/L de lactato de etilo.
A. Microscopía de contraste de fase. B. Microscopía de fluorescencia con tinción con rojo nilo.
La escala hace referencia a 20 µm.

En los controles de las tres líneas celulares (figura 4.14-A) se observó como las células Cos-7 mostraron su morfología fibroblástica característica con tendencia esférica, las células A375 presentan una morfología epitelial poligonal plana y las células HaCaT una morfología poligonal similar. Los tres cultivos crecieron en

monocapa. Tras la incubación con el lactato de etilo, tanto las células Cos-7 como HaCaT, presentaron una disminución de la densidad celular, una menor formación de colonias celulares y presencia de algunas vesículas refringentes intracelulares. Además, en el caso de las células Cos-7, se observó una alteración de la membrana celular, por lo que dicha pérdida de integridad podría resultar en la liberación de los contenidos citoplasmáticos y en muchas ocasiones estar vinculados a procesos de apoptosis o necrosis [85]. La tinción con RN (figura 4.14-B) mostró en las líneas celulares Cos-7 y HaCaT un punteado de color oro-amarillo característico de cúmulo de lípidos y producto del estrés celular sufrido por un agente externo [173, 174], como se observó también previamente para la familia de los levulinatos. Estos efectos no se observaron en las células A375, las cuales mantuvieron una morfología similar a la encontrada en el control y no se observó marcaje de estrés celular.

Para el estudio de la fragmentación de ADN se trataron las tres líneas celulares con 2000 mg/L de cada uno de los disolventes de la familia lactato durante 24 horas. Los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis no mostraron diferencias significativas entre los disolventes y el control negativo en las líneas Cos-7, A375 y HaCaT. Por ello, estos compuestos no parecen presentar efecto genotóxico, al menos, a las 24 horas. Este hecho ya se observó en un estudio sobre la mutagenicidad del L-lactato de etilo dando también una ausencia de la misma [94].

4.3 Familia de los furfurales

Evaluación del perfil tóxico de la familia del furfural

Tras la realización del ensayo del MTT con los compuestos de la familia del furfural se obtuvieron los valores de viabilidad celular para las diferentes dosis testadas en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT, los cuales se presentan en la figura 4.15.

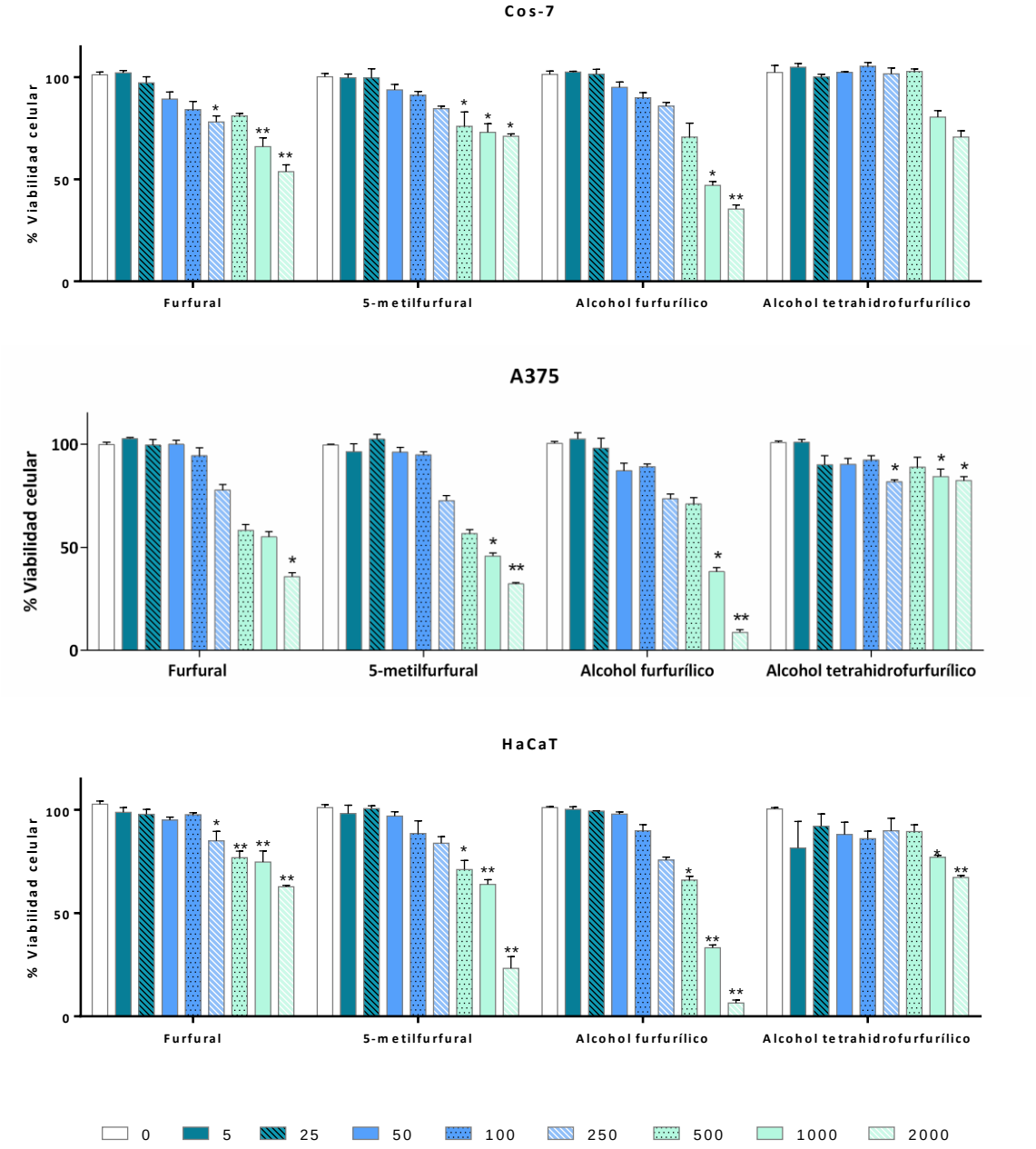


*Figura 4.15. Representación de la citotoxicidad basal obtenida en líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes de los compuestos de la familia de los furfurales. Se representan los valores medios ± el error estándar de la media, obtenidos para el ensayo MTT. Diferencias significativas respecto al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.*

Esta figura muestra un efecto dosis dependiente sobre el porcentaje de viabilidad celular y también cómo el perfil citotóxico de los disolventes presentó diferencias significativas respecto al control a partir de 250 mg/L en las tres líneas

celulares. Estos datos sugieren, que esta familia de disolventes puede estar ejerciendo un posible daño oxidativo a nivel mitocondrial. De hecho, *Gupta et al*. observaron que la inhalación de vapor de furfural (40 ppm), durante 1 hora al día y 30 días de estudio, en ratas produjo un daño en el metabolismo oxidativo mitocondrial debido a la inhibición de la enzima arginasa en los pulmones de estos animales [179].

Los valores de IC_{50} obtenidos para cada compuesto y línea celular a partir de las dosis testadas, se presentan en la siguiente tabla 4.15.

Tabla 4.15. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos en la familia de los furfurales para el ensayo de inhibición de AChE y el ensayo MTT en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT. Los datos se representan como media ± error estándar de la media.

IC_{50} (mg/L)	**Furfural**	**5-metilfurfural**	**Alcohol furfurílico**	**Alcohol tetrahidrofurfurílico**
MTT (Cos-7)	1852 ± 193,2	2625 ± 356,3	1059 ± 62,6	5798 ± 866
MTT (A375)	998,7 ± 73,9	800,9 ± 48,9	695,6 ± 71,9	5582 ± 1025
MTT (HaCaT)	2537 ± 269,3	1191 ± 121,0	664,2 ± 54,6	3484 ± 730,8
AChE	3139 ± 444,4	2186 ± 317,4	9174 ± 1153,0	>20000

Estos datos muestran cómo el alcohol tetrahidrofurfurílico fue el compuesto menos citotóxico de la familia en todas las líneas celulares testadas. Su baja citotoxicidad confirmaría el hecho de que este compuesto sea utilizado como solvente sustituto del DMSO en fármacos inyectables poco solubles en agua. A pesar de ello se ha observado que su administración intravenosa produjo una disminución en la presión arterial y una moderada actividad hemolítica [180, 181]. Además, un estudio sobre la toxicidad producida en el desarrollo y reproducción de ratas siguiendo la guía OECD 421, estableció que la concentración máxima de exposición al alcohol tetrahidrofurfurílico a la cual no se observó ningún efecto negativo en ratas fue de 50 mg/Kg/día [182].

Sin embargo, el furfural, 5-metilfurfural y alcohol furfurílico presentaron valores experimentales de IC_{50} por debajo de la máxima concentración testada en los ensayos

(tabla 4.15), 2000 mg/L, por lo que debe tenerse en cuenta su potencial como citotóxicos. Por el contrario, desde el punto de vista toxicológico alimentario, diferentes estudios han determinado que ninguno de estos compuestos presenta riesgo en los niveles alimenticios a los que se ingieren cuando son utilizados como sustancias aromatizantes, haciendo uso de un modelo teórico de estimación de la cantidad de aromatizante máxima ingerida por persona diariamente (en Europa se estima un consumo entre 0,0012 a 37 µg/persona/día) [183]. *Chai et al.* concluyeron que tanto el furfural como el alcohol furfurílico producen un efecto inhibitorio sobre la acción de la enzima tirosinasa, disminuyendo la proliferación de diferentes poblaciones bacterianas como *Salmonella bacteria* y *Bacillus subtilis*. Esta enzima ayuda a las bacterias y sus esporas a defenderse frente a cambios ambientales (radiación Ultravioleta, metales pesados, etc.). Por lo que estos compuestos pueden ser desarrollados con usos potenciales como bioinsecticidas y antimicrobianos [184].

Los valores de IC_{50} (tabla 4.15) indicaron que el compuesto más citotóxico de la familia fue el alcohol furfurílico. Dicha citotoxicidad ha sido estudiada *in vivo* en ratones expuestos a concentraciones de 1000, 2000 y 4000 ppm de este compuesto a diferentes tiempos entre 5 y 90 días, presentándose como hepatotóxico [185]. Sin embargo, ratas expuestas al vapor del alcohol furfurílico durante 14 días (durante 6 horas al día y hasta 250 ppm de compuesto), no presentaron daños toxicológicos significantes en el peso de órganos, ni cambios adversos en parámetros hematológicos, aunque sí irritación nasal y del epitelio pulmonar [186].

Atendiendo al perfil neurotóxico, se consideró que los compuestos no presentaron actividad para la inhibición de la acetilcolinesterasa por sus valores de IC_{50} superiores a 2000 mg/L, tal y como puede observarse en la tabla 4.15. El 5-metilfurfural es el compuesto que presentó un mayor perfil neurotóxico y el alcohol tetrahidrofurfílico el menor. Estos datos concuerdan con la ausencia de efecto en la enzima acetilcolinesterasa cerebral y en la colinesterasa sérica tras la administración oral en ratas de 6,5 mg/kg/día de furfural durante 14 días observada en otro estudio [187].

Para esta familia no existe una relación estructural con sustituyentes alquílicos. Sin embargo, para la medida de inhibición de AChE se obtuvo mayor toxicidad del furfural y del 5-metilfurfural que para los otros dos compuestos alcohólicos, tal y como se observó en la evaluación de ecotoxicidad de esta familia. De hecho, *Chai et al*. vincularon mayor efecto inhibidor de tirosinasa y, por tanto, mayor efecto tóxico del furfural frente al alcohol furfurílico por la estabilidad que el grupo aldehído puede dar al comportarse como base de Schiff [184].

Observación de efectos de toxicidad tras el contacto con los disolventes

Siguiendo con el patrón de las otras dos familias, se realizaron diferentes ensayos tras la incubación de los cultivos durante 24 horas de los disolventes a 2000 mg/L. En la tabla 4.16 se presentan los valores de viabilidad celular y CPT tras 24 horas de exposición con cada disolvente de la familia.

Tabla 4.16. Valores de viabilidad celular y CPT a 2000 mg/L en cada línea celular para la familia de los furfurales. Los datos son presentados como la media ± el error estándar de la misma.

	%	Furfural	5-metilfurfural	Alc. furfurílico	Alc. tetrahidro-furfurílico
Cos-7	**Viabilidad celular**	53,72 ± 3,33	71,07 ± 1,19	35,39 ± 2,05	70,70 ± 3,01
	CPT	60,50 ± 1,24	66,38 ± 3,65	94,10 ± 2,13	82,63 ± 1,82
A375	**Viabilidad celular**	36,72 ± 2,70	32,55 ± 1,06	8,08 ± 2,09	81,11 ± 3,52
	CPT	62,31 ± 3,12	71,75 ± 4,01	59,76 ± 5,58	97,42 ±1,08
HaCaT	**Viabilidad celular**	62,69 ± 0,70	23,22 ± 5,66	6,85 ± 2,52	67,89 ± 1,27
	CPT	69,31 ± 6,34	73,37 ± 9,02	70,16 ± 14,82	86,54 ± 4,01

La exposición de los cultivos con los disolventes produjo una disminución de CPT, siendo esta menor para el alcohol tetrahidrofurfurílico, el compuesto menos citotóxico de la familia. El furfural y el 5-metilfurfural presentaron una disminución mayor en el porcentaje de proteínas con respecto al control, hasta un 60%. De hecho, existen efectos negativos de los disolventes que deben atenderse más allá del valor de IC_{50} obtenido, así el furfural se confirmó como agente irritante de la membrana

mucosa, piel y ojos en un estudio realizado a trabajadores que mantuvieron contacto con ese disolvente, aunque su baja volatilidad hace que su inhalación sea casi imposible [188]. Este hecho se complementa con el estudio de *Gupta et al.* mencionado con anterioridad, en el que se indicó que el furfural causa irritación pulmonar, daño parenquimatoso y regeneración proliferativa de pneumocitos de tipo II en la exposición de ratas a vapor de furfural [179].

A pesar de haberse encontrado estudios sobre la toxicidad y otros efectos negativos por la exposición a los compuestos de esta familia, la bibliografía hace referencia a la metabolización de estos compuestos en sistemas *in vivo* por lo que los resultados de toxicidad pueden diferir con aquellos realizados *in vitro*, donde los compuestos no han sufrido ninguna activación metabólica [189].

De hecho, el vapor de furfural es absorbido a través de la piel y de los pulmones. Este compuesto se metaboliza en los seres humanos en metabolitos como el 2-furoilglicina (se excreta fundamentalmente por la orina), el ácido furoico o el ácido furanacrilúrico [190]. Esta metabolización es similar a la observada en ratas debido a la oxidación del grupo aldehído [191]. Sin embargo, los datos sobre la toxicidad aguda de estos metabolitos en animales son variables y poco claros.

El furfural es tóxico por inhalación, por vía oral (LC_{50} (4h), 940 mg/m^3; LD_{50} (oral), 120 mg/kg de peso corporal) y ocular, no disponiéndose de información clara en relación con la vía cutánea, aunque sí se ha observado que genera irritación. Aparentemente no se ha detectado irritación en la garganta o en los ojos en personas expuestas a 40 mg/m^3 (10 ppm) durante ocho horas o a 80 mg/m^3 (20 ppm) durante cuatro horas. Además, se han determinado concentraciones sin efectos adversos observados (NOAEL) de 80 mg/m^3 (20 ppm) y 208 mg/m^3 (52 ppm) en estudios de hasta 13 semanas de duración en hámsteres y conejos, respectivamente. Sin embargo, se han observado tumores malignos y benignos en ratas y ratones tras la exposición oral a 60 y 50 mg/kg de peso corporal, respectivamente, durante 103 semanas. En definitiva, no se puede descartar la posibilidad de generar efectos negativos en el organismo [190].

Con el fin de seguir conociendo los efectos de los disolventes sobre los cultivos celulares, se estudiaron los cambios morfológicos mediante microscopia de CF y tras la tinción con RN. La figura 4.16 muestra diferentes imágenes obtenidas de las células tras la exposición al alcohol furfurílico, el compuesto más citotóxico de la familia.

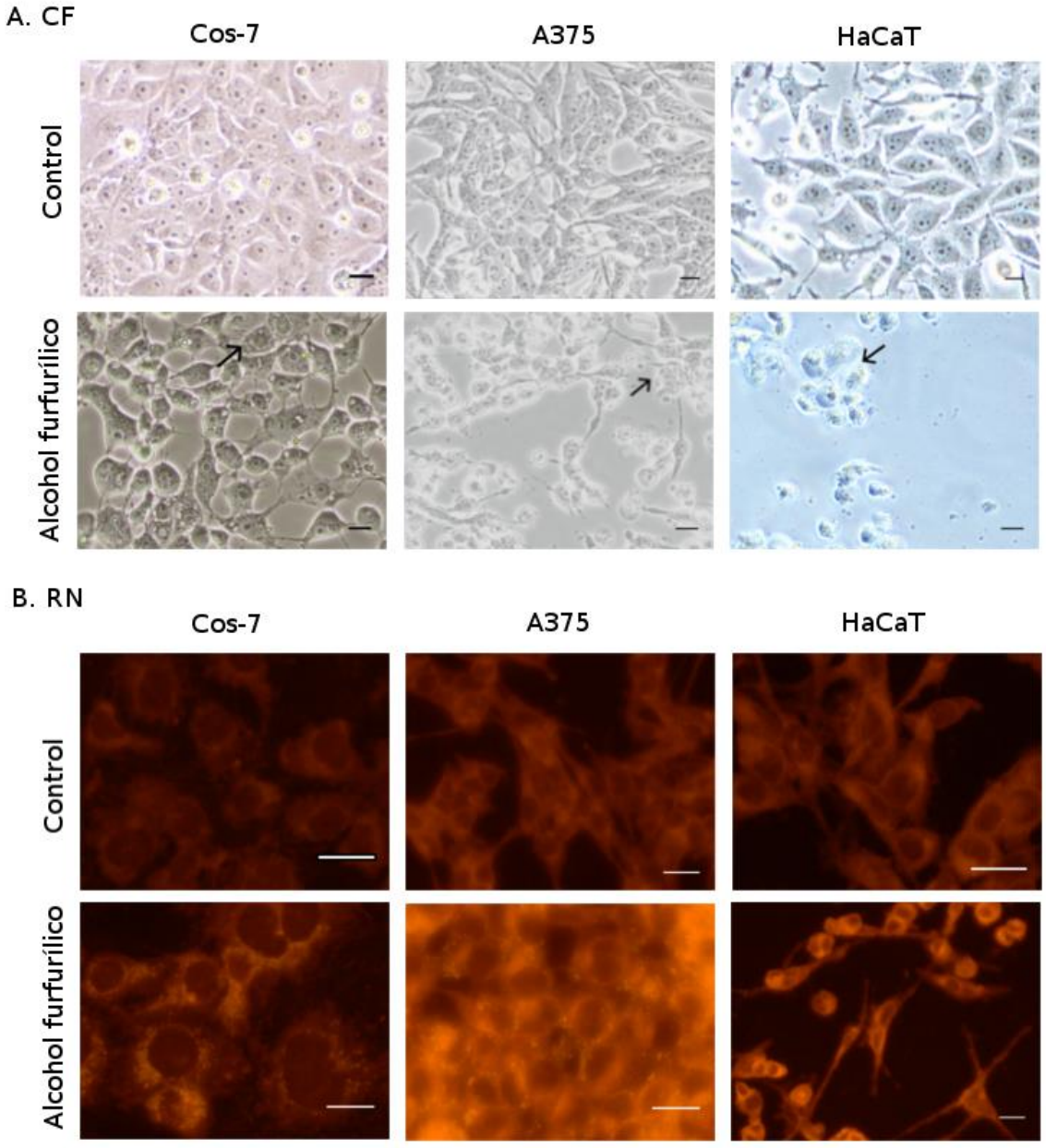


Figura 4.16. Imágenes de los cultivos celulares Cos-7, HaCaT y A375 en condiciones basales y tras exposición durante 24 horas a 2000 mg/L de alcohol furfurílico.
A. Microscopía de contraste de fase. B. Microscopía de fluorescencia con tinción con rojo nilo. La escala hace referencia a 20 µm.

La morfología habitual fibroblástica esférica de las células Cos-7 (figura 4.16-A) se observó poco modificada tras la exposición al alcohol furfurílico, sin embargo, se detectó una ligera disminución de densidad celular así como la presencia de vesículas refringentes. Por el contrario, la morfología característica epitelial poligonal de las células A375 y HaCaT varió considerablemente cuando se expusieron al alcohol furfurílico, presentando formas más esféricas, con poca densidad celular e incluso, observándose células no adheridas (figura 4.16-A). La tinción con RN mostró un punteado oro-amarillo característico que corresponde directamente a un cúmulo de lípidos refráctiles [173, 174], visto previamente por microscopía de CF en las tres líneas celulares, generado por el estrés celular sufrido tras la incubación con el alcohol furfurílico (figura 4.16-B).

Con el fin de conocer los posibles indicios de genotoxicidad, se realizó una electroforesis utilizando fracciones de ADN obtenidas tras la exposición de las células a los disolventes y a controles negativo y positivo (H_2O_2 0,1%). No se encontraron diferencias en el patrón de bandas de los compuestos y los controles negativos por lo que estos compuestos, a 24 horas de contacto, no presentaron efecto genotóxico.

Estos resultados son coherentes con estudios que indican la ausencia de mutagenicidad del alcohol furfurílico tras el análisis *in vitro* de genotoxicidad usando el ensayo de aberración de cromosoma e intercambio de cromátidas en linfocitos humanos a 24, 48 y 72 horas de exposición a 240, 480 y 960 ppm [189]. Tampoco se observó, en otros estudios, daño genético de este alcohol y del furfural en células sanguíneas de trabajadores expuestos a estos compuestos [192]. Por otro lado, existen trabajos que afirmaron que el furfural es claramente genotóxico *in vitro* en células de mamíferos [190]. Esto podría estar indicando que el mecanismo por el cual se produce la genotoxicidad no está relacionado con la fragmentación de ADN. Dado la existencia de ciertos trabajos bibliográficos que apuntaron hacia una posible genotoxicidad, sería necesario un estudio en mayor profundidad de la genotoxicidad de este compuesto.

4.4 Comparativa de la toxicidad en las tres familias estudiadas

Una vez se han presentado y discutido los diferentes resultados obtenidos en cada una de las familias de disolventes estudiados, en este apartado se recapitula la información más relevante de todos los compuestos en su conjunto.

Debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos con ensayos *in vitro* sólo pueden dar información sobre los posibles peligros que una sustancia química puede tener. Tanto la medida de inhibición de la AChE como el ensayo de reducción del MTT resultaron ser dependientes de la concentración generando un efecto negativo mayor cuanto mayor era la concentración de exposición.

En la figura 4.17 se representan gráficamente los valores de IC_{50} obtenidos para todos los compuestos en el ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa.

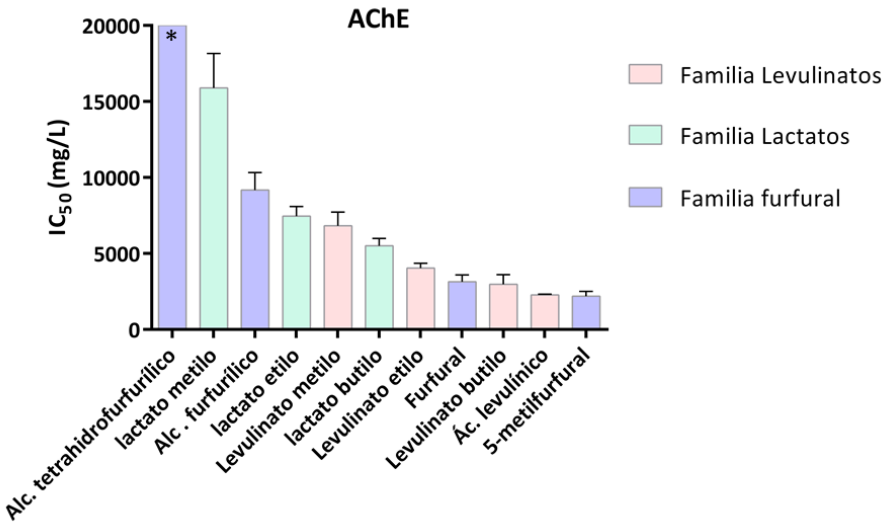


Figura 4.17. Valores de IC_{50} (mg/L) obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa para todos los compuestos bajo estudio de esta tesis doctoral. Las barras de valores se presentan como media ± el error estándar de la media.
** El valor de IC_{50} representado para el alcohol tetrahidrofurfurílico es >20000 mg/L.*

Todos los compuestos presentaron un valor de IC_{50} por encima de 2000 mg/L, lo cual sugiere un bajo perfil neurotóxico. Además, la inhibición de la enzima AChE en el ensayo *in vitro* realizado no tiene porqué indicar que provoque un efecto a nivel de

todo el organismo. Para que esto ocurra, es necesario que la sustancia química alcance el centro activo de la enzima [42]; por lo que para conseguir una inhibición de AChE en un organismo *in vivo*, sería necesario estar expuesto a cantidades muy elevadas del mismo. No obstante, destacan los valores de IC_{50} altamente elevados del alcohol tetrahidrofurfurílico y del lactato de metilo indicando ser los dos disolventes con menor perfil neurotóxico de los estudiados. Por el contrario, el ácido levulínico y el 5-metilfurfural presentaron los valores más bajos de IC_{50}, próximos a 2000 mg/L, resultando ser los compuestos con mayor riesgo en generar inhibición de dicha enzima y, por tanto, tener un efecto neurotóxico.

Estos resultados muestran que la estructura está correlacionada con la toxicidad, dado que al aumentar la cadena lateral sustituyente en los ésteres estudiados (lactatos y levulinatos), el efecto inhibidor de la enzima fue más fuerte. Esto también se ha comprobado en algunos líquidos iónicos por *Stock et al.* [42].

En la figura 4.18 se presenta el valor de IC_{50} obtenido en el ensayo de reducción del MTT tras 24 horas de exposición de todos los compuestos estudiados en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT.

La línea Cos-7 presentó valores de IC_{50} superiores al resto de las líneas utilizadas para la mayoría de los disolventes estudiados. Sin embargo, en los ensayos de microscopía esta línea celular mostró mayor número de gotas lipídicas para los disolventes. Esto podría indicar que estas células son las que disponen de mayor capacidad de sobrevivir en condiciones extremas. Cabe mencionar también, que en la línea celular HaCaT existe una cierta homogeneidad en los valores de IC_{50} obtenidos para la mayoría de los disolventes estudiados sin perder de vista que el mecanismo de acción depende de cada línea celular.

Atendiendo a la citotoxicidad estudiada de los compuestos, la familia furfural destaca por ser aquella que presentó los valores de IC_{50} más bajos en las tres líneas celulares, a excepción del alcohol tetrahidrofurfurílico, cuya tendencia es estar entre los compuestos menos citotóxicos, tal y como puede observarse en la figura 4.18.

Estos datos concuerdan con los ensayos de neurotoxicidad, destacando en ambos ensayos el 5-metilfurfural por sus valores más bajos de IC_{50}.

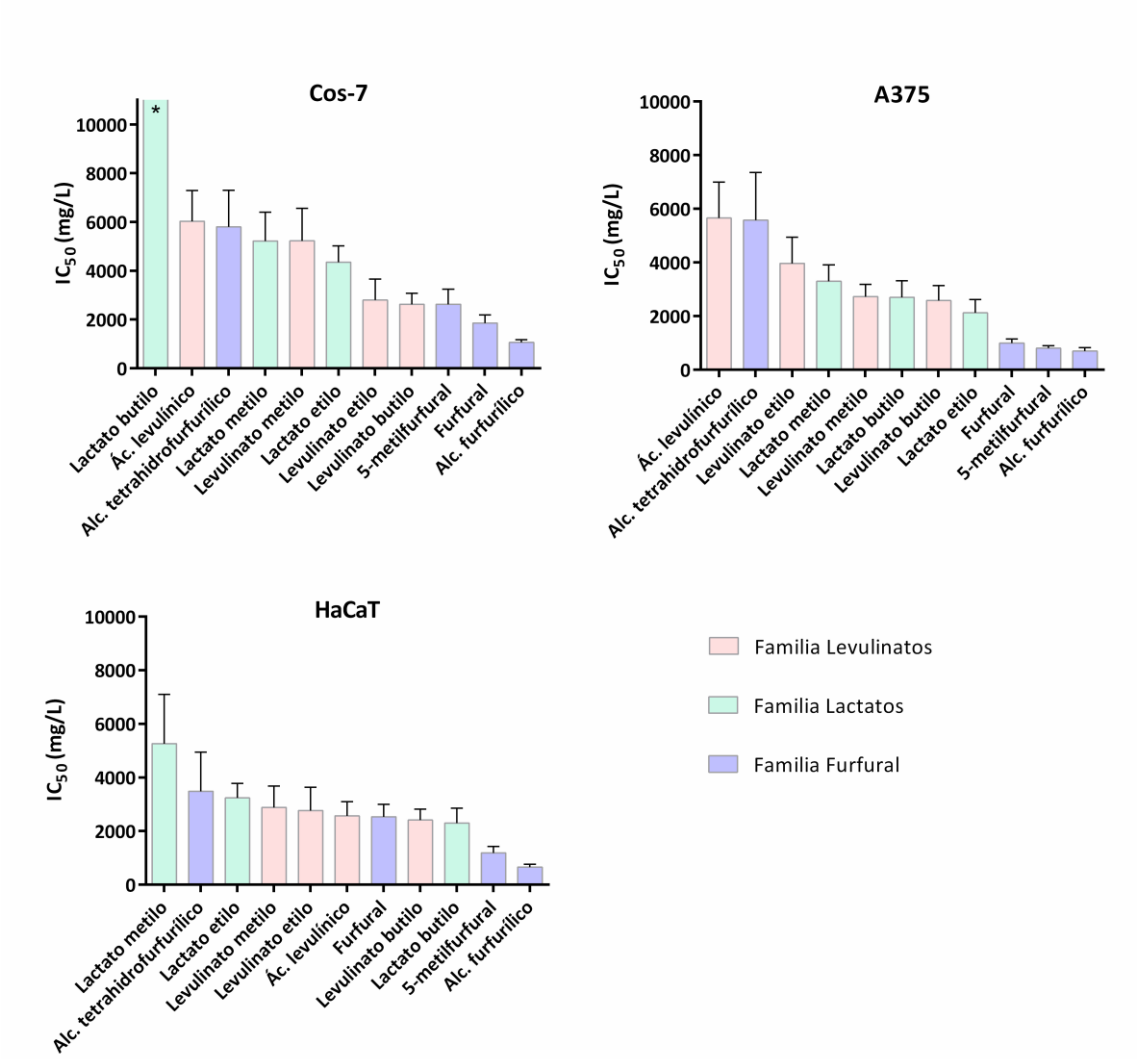


Figura 4.18. Representación del valor de IC_{50} (mg/L) obtenido en el ensayo de reducción del MTT tras exposición de los compuestos bajo estudio durante 24 horas en las líneas celulares Cos-7, A375 y HaCaT. Las barras de valores se presentan como media ± el error estándar de la media.

** El valor de IC_{50} representado para el lactato de butilo es superior al límite representado en la gráfica.*

Por otro lado, teniendo en cuenta la "UFT Merck ILs Biological Effects Database" (http://www.il-eco.uft.uni-bremen.de) se puede encontrar una clasificación de citotoxicidad, la cual, está basada en medidas de citotoxicidad en células IPC-81 para líquidos iónicos (cuyos pesos moleculares son mucho mayores que los disolventes

estudiados en esta tesis). En ella, se clasifican los compuestos con una IC_{50} > 5 mM como compuestos con baja citotoxicidad. A pesar de la diferencia en la línea celular y en los compuestos bajo estudio, otros autores han hecho uso de esta clasificación [171]. En el trabajo realizado en esta tesis, todos los compuestos ensayados presentaron un valor de IC_{50} por encima de 5 mM, siendo el valor de IC_{50} más bajo encontrado el del alcohol furfurílico en la línea A375 (IC_{50} = 664,8 mg/L = 6,78 mM). Por lo que esto sugiere que la citotoxicidad de los once disolventes es baja, prestando especial atención a los que obtuvieron un valor de IC_{50} < 2000 mg/L, como son el furfural, 5-metilfurfural y alcohol furfurílico.

El estudio de morfología celular, tras la exposición a los disolventes, mostró una disminución en la densidad celular generalizada y alteración en la formación de colonias celulares con todos los disolventes. Este efecto se observó menos acusado para los compuestos de la familia de los lactatos y el alcohol tetrahidrofurfurílico, coincidiendo con su baja citotoxicidad y más notorios en compuestos como el alcohol furfurílico, el furfural o el 5-metilfurfural, que coinciden con los disolventes que resultaron más citotóxicos. Además, estos disolventes presentaron mayor presencia de gotas lipídicas debidas a estrés celular por la exposición a los mismos. Es por ello que, aunque los valores de IC_{50} obtenidos para los disolventes en ocasiones no hayan sido bajos, al igual que ocurría en los peces, debe tenerse en cuenta la existencia de procesos de estrés celular que podrían derivar en mayor citotoxicidad en periodos de exposición más largos.

En base a los posibles indicios de genotoxicidad, únicamente se obtuvo fragmentación de ADN al exponer 2000 mg/L del levulinato de etilo durante 24 horas en la línea celular A375. No obstante, y dado que existe algún estudio en los que se apunta a posible genotoxicidad del furfural en células de mamíferos [190] o efectos de alteración genética en *E. coli* en el ácido levulínico [176] un estudio en mayor profundidad y a mayores tiempos de exposición daría una información más amplia.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que en la evaluación de la citotoxicidad *in vitro*, los compuestos se ponen en contacto directamente con los cultivos celulares

sin encontrarse sometidos a ningún proceso de activación metabólica que modifique los compuestos de partida como ocurriría si la exposición fuera a nivel de todo el organismo [189].

5. COMPARACIÓN ENTRE LOS DISOLVENTES ESTUDIADOS Y LOS DISOLVENTES TRADICIONALES

En este apartado se llevó a cabo una comparativa entre la ecotoxicidad y toxicidad de los disolventes estudiados con ciertos disolventes tradicionales para alcanzar el quinto objetivo de esta tesis.

El uso de disolventes tradicionales produce problemas medioambientales bien conocidos, en parte por el agotamiento de materia prima no sostenible (recursos fósiles) y por la posibilidad de liberar compuestos químicos dañinos al entorno. Es por ello, que resulta esencial, encontrar disolventes con propiedades similares pero que no generen ningún riesgo y, por tanto, puedan sustituir a los tradicionales.

5.1. Comparativa en ecotoxicidad

Las tablas A1, A2 y A3 de los Anexos II recogen los valores de EC_{50} y LC_{50} obtenidos de la bibliografía para diferentes disolventes tradicionales en los organismos estudiados: *V. fischeri, D. magna* y *D. reri*o.

Al comparar dichos valores con los obtenidos en esta tesis de manera experimental, se observa como para la bacteria *V. fischeri,* el levulinato de butilo presentó, de entre los once disolventes estudiados, el valor de toxicidad aguda más bajo, 83 mg/L, muy similar al valor presentado para el tolueno (EC_{50} = 91,2 mg/L [193]) o ligeramente superior al presentado por el fenol (EC_{50} = 41,7 mg/L [193]). Por otro lado, el lactato de metilo que resultó ser el compuesto de los estudiados menos tóxico

para esta bacteria, tiene similar valor de EC_{50} al de la acetona (EC_{50} = 19900 mg/L [69]), el cual se ha clasificado como relativamente inofensivo al igual que otros disolventes tradicionales tales como el etanol (EC_{50} = 45700 mg/L [69]) o el dietil éter (EC_{50} = 38300 mg/L [69, 96]).

Respecto a la toxicidad aguda observada experimentalmente en *D. magna,* se obtuvieron dos disolventes con un valor de EC_{50} inferior a 100 mg/L: el furfural y el 5-metilfurfural. La toxicidad frente a este organismo acuático es comparable a la del disolvente tradicional, m-clorofenol (EC_{50} = 15,78 mg/L [194]). Por otro lado, el alcohol tetrahidrofurfurílico, el ácido levulínico, el levulinato de metilo y el lactato de metilo fueron los disolventes que presentaron valores altos de EC_{50} y similares a los presentados por disolventes como la acetona (EC_{50} = 7600 mg/L [195]) o el butanol (EC_{50} = 16233 mg/L [195]).

Para los resultados experimentales del ensayo con *D. rerio*, también se ha podido establecer comparaciones con valores de toxicidad de disolventes tradicionales. Así, el lactato de butilo, el levulinato de etilo y butilo y el furfural presentaron valores de LC_{50} similares a los que presentan algunos disolventes tradicionales como son el ácido tricloroacético (EC_{50} = 86,6 mg/L), el fenol (EC_{50} = 49,1 mg/L) o el 1,2-diclorobenceno (EC_{50} = 13,85 mg/L) [196]. Por otro lado, el alcohol tetrahidrofurfurílico, el ácido levulínico y el lactato de metilo mostraron una baja toxicidad para peces al igual que la acetona (EC_{50} = 13091,23 mg/L [197]).

5.2. Comparativa en citotoxicidad

La comparativa con datos de citotoxicidad resulta más compleja, ya que los estudios utilizan una amplia variedad de líneas celulares. Así, por ejemplo, ciertos disolventes tradicionales como el etanol, tolueno, diclorometano y DMSO presentan valores de IC_{50} por encima de 2000 mg/L en las líneas CCO y MCF-7 tras 72 horas de contacto [171]. De igual modo, el metanol, acetona, metil terbutil éter o acetonitrilo en células IPC-81 no presentaron toxicidad por debajo de 2000 mg/L de cada disolvente durante 48 horas de contacto con los mismos [198]. Estos valores son

comparables a la mayor parte de los disolventes derivados de la biomasa estudiados en esta tesis. En estas mismas células de rata IPC-81, se obtuvieron valores de baja citotoxicidad para el metanol (IC_{50} = 1600 mM), etanol (IC_{50} = 700 mM) y propanol (IC_{50} = 100 mM) [199], valores de IC_{50} muy superiores a cualquiera de los obtenidos para los disolventes ensayados.

Sin embargo, aunque para algunos disolventes tradicionales los valores de ecotoxicidad y toxicidad sean bajos, el beneficio en el uso de disolventes verdes, como los derivados de la biomasa, reside en las propiedades de que buena parte de ellos disponen de baja presión de vapor, alta temperatura de ebullición, su coeficiente de reparto no elevado o su procedencia de fuentes naturales.

6. RELACIONES ENTRE LAS PROPIEDADES ESTUDIADAS EN LOS DISOLVENTES DE LA BIOMASA

Para alcanzar el último objetivo "Buscar relaciones entre la ecotoxicidad y toxicidad y las propiedades fisicoquímicas" se analizaron de manera conjunta todos los resultados obtenidos, bibliográfica y experimentalmente.

En la tabla A4 incluida en el Anexo III, se han recopilado las propiedades fisicoquímicas estudiadas (efecto de la solubilidad, el valor de *c.a.c*. y la hidrofobicidad) y los resultados de ecotoxicidad y toxicidad aguda obtenidos para todos los disolventes estudiados para determinar la distribución de los disolventes en el medio ambiente y poder conocer el comportamiento e interacción con los organismos o en los medios celulares [200].

A continuación, se presenta un análisis y relación general de las propiedades fisicoquímicas y su posible efecto sobre la ecotoxicidad y toxicidad:

- Los disolventes que tienen una menor solubilidad en agua y mayor tendencia de agregación (menor *c.a.c*.) presentaron una ecotoxicidad acuática mayor en general. Este es el caso del levulinato de butilo, lactato de butilo y 5-metilfurfural. Sin embargo, el alcohol furfurílico, que es totalmente soluble en agua, y el furfural (menos soluble), ambos con valores elevados de *c.a.c*. presentaron una ligera toxicidad para algunos de los organismos acuáticos. Por tanto, se podría concluir que estas propiedades definen adecuadamente el comportamiento ecotoxicológico de los disolventes estudiados a excepción del furfural y el alcohol furfurílico. En el caso de la citotoxicidad, la relación observada fue igual que en ecotoxicidad para la mayor parte de líneas celulares. Sin embargo, en los resultados de neurotoxicidad la relación con las propiedades fisicoquímicas, no resultó tan evidente.

- Todos los disolventes presentaron un valor de *log P* inferior a 1, a excepción del levulinato de butilo, el cual presentó un valor ligeramente superior (*log P* = 1,36), y por tanto, es el disolvente con mayor carácter lipofílico. También, el lactato de butilo y el 5-metilfurfural presentaron un coeficiente mayor (*log P* ≅ 0,6) que el resto de disolventes, de modo que se relacionó la lipofilia de estos tres disolventes con un mayor efecto ecotoxicológico en los organismos acuáticos estudiados. Los valores más bajos de log P se relacionaron con una menor ecotoxicidad de los disolventes. Sin embargo y como excepción, a pesar de disponer de valores de *log P* menores, el furfural y el alcohol furfurílico presentaron valores más altos de ecotoxicidad para alguno de los organismos acuáticos, indicando que la relación hidrofobicidad-ecotoxicidad en la familia furfural no se encuentra del todo clara.

  Respecto a la citotoxicidad y la neurotoxicidad, el comportamiento es similar, siendo aquellos disolventes con valores negativos de *log P* los que presentaron menor efecto tóxico. Por otro lado, el levulinato de butilo (valor de *log P* más alto) no fue el disolvente con mayor actividad tóxica aunque sí fue de las más elevadas. Del mismo modo, el furfural y alcohol furfurílico

presentaron mayor efecto citotóxico a pesar de tener valores más bajos de *log P* que otros disolventes como el 5-metilfurfural o el levulinato de butilo.

Tras el análisis de las anteriores relaciones, se ha podido observar que estas propiedades fisicoquímicas seleccionadas definen adecuadamente muchos de los efectos (eco)tóxicos para todos los disolventes, a excepción del furfural y el alcohol furfurílico.

7. RESULTADOS GENERALES: CARÁCTER VERDE DE LOS DISOLVENTES ESTUDIADOS

Como se comentó con anterioridad, los disolventes seleccionados en esta tesis doctoral han sido considerados verdes sin haber realizado estudios en profundidad que permitan categorizarlos de esta manera. Para caracterizar una sustancia química, se deben analizar y evaluar de manera completa un conjunto de propiedades: fisicoquímicas, ecotoxicológicas y toxicológicas. Por lo que el diseño experimental llevado a cabo en este trabajo ha permitido el conocimiento profundo de los once disolventes.

De acuerdo a las características que la *Green Chemistry* recomienda para un disolvente verde [10], los disolventes de las tres familias estudiadas disponen de una presión de vapor baja, elevado punto de ebullición, son de bajo coste, presentan un amplio rango de polaridad, no tienen tendencia a acumularse y proceden de recursos renovables, tal y como pudo observarse en la búsqueda bibliográfica.

Sin embargo, la evaluación de los efectos tóxicos de estos disolventes no se encontraba completa y fue necesario realizar una evaluación de la ecotoxicidad y toxicidad de los mismos. Esta evaluación resulta fundamental para valorar el daño potencial asociado al uso de los disolventes. Por todo ello, a lo largo de esta tesis se ha

profundizado en el conocimiento del comportamiento de los disolventes estudiados y se está en mejor disposición de determinar la idoneidad del uso de los mismos.

A continuación, se presenta la tabla 4.17 como resumen de las diferentes toxicidades observadas para cada disolvente estudiado. Se valoró como ausencia de efecto ecotóxico (√) a aquellos disolventes que para los tres organismos acuáticos ensayados obtuvieron un valor de EC_{50} > 1000 mg/L. Del mismo modo, se determinó la ausencia de neurotoxicidad en el ensayo de inhibición de la AChE (√) y de citotoxicidad en las tres líneas celulares (√) cuando se obtuvo un valor de IC_{50} > 2000 mg/L. Y por último, también se tuvo en cuenta la ausencia de indicios de genotoxicidad cuando no se observó fragmentación de ADN (√).

Tabla 4.17. Resumen de la toxicidad observada para los once disolventes estudiados en esta tesis doctoral. "√" indica sin efectos de toxicidad; "X" indica efectos de toxicidad observados.

Compuesto	Ecotoxicidad	Neurotoxicidad	Citotoxicidad	Genotoxicidad
Ácido levulínico	√	√	√	√
Levulinato de metilo	X	√	√	√
Levulinato de etilo	X	√	√	X
Levulinato de butilo	X	√	√	√
Lactato de metilo	√	√	√	√
Lactato de etilo	√	√	√	√
Lactato de butilo	X	√	√	√
Furfural	X	√	X	√
5-metilfurfural	X	√	X	√
Alc. furfurílico	√	√	X	√
Alc. tetrahidrofurfurílico	√	√	√	√

Esta evaluación permitió determinar que el ácido levulínico, el alcohol tetrahidrofurfurílico y el lactato de metilo fueran los compuestos que pueden

considerarse relativamente inofensivos según la clasificación de Passino y Smith para los tres organismos acuáticos estudiados.

El ensayo de inhibición de AChE indicó un bajo perfil neurotóxico de todos los disolventes estudiados, sin embargo, los valores de IC_{50} obtenidos para el ácido levulínico y el 5-metilfurfural se encontraron próximos al límite de 2000 mg/L por lo que resultan ser los disolventes con mayor potencial neurotóxico y susceptibles de realizar más pruebas.

Tras la evaluación de la citotoxicidad se comprobó que los disolventes de la familia de los levulinatos, de los lactatos y el alcohol tetrahidrofurfurílico no presentaron toxicidad celular. Además, los estudios de microscopía determinaron menores efectos negativos al contacto con los lactatos de metilo, etilo y butilo y el alcohol tetrahidrofurfurílico. Por otro lado, el medio ácido generado por el ácido levulínico generó alteraciones en los cultivos celulares.

El estudio de fragmentación de ADN no reveló indicios de genotoxicidad a 24 horas de contacto con ninguno de los disolventes estudiados, a excepción del levulinato de etilo.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto podemos determinar que el lactato de metilo, el lactato de etilo y el alcohol tetrahidrofurfurílico son los disolventes que menor toxicidad presentaron y que, por tanto, mejor cumplen todas las características que definen a un disolvente verde.

5

Conclusiones





Tras el análisis de los resultados obtenidos y la discusión de los mismos se destacan las siguientes conclusiones derivadas de este trabajo:

1. La revisión bibliográfica realizada ha permitido seleccionar once disolventes derivados de la biomasa divididos en tres familias con relación estructural y recopilar las propiedades fisicoquímicas que permiten predecir su comportamiento. A pesar de que cumplen los principios establecidos en la *Green Chemistry*, la información relativa a su ecotoxicidad y toxicidad, así como la comparación de compuestos dentro de una misma familia no era completa.

2. Los resultados experimentales obtenidos en ecotoxicidad, citotoxicidad y neurotoxicidad han facilitado establecer una relación toxicidad-estructura, siendo ésta más evidente para los organismos acuáticos. En el caso de las familias de los lactatos y levulinatos, la toxicidad incrementa al aumentar el número de átomos de carbono que tienen en la cadena sustituyente. En el caso de la familia de los furfurales se ha encontrado que la ausencia de dobles enlaces en el ciclo de estos compuestos disminuye la ecotoxicidad y toxicidad.

3. Los valores de las concentraciones de efecto media (EC_{50}/LC_{50}/IC_{50}) se toman como referencia en estudios de toxicidad aguda, sin embargo, este trabajo ha reflejado que valores por debajo de las mismas pueden generar daños teratogénicos, alteraciones morfológicas y, por tanto, provocar efectos negativos derivados del uso prolongado de los disolventes.

4. El estudio de genotoxicidad no ha mostrado indicios de efectos dañinos en el ADN tras 24 horas de exposición, excepto en el caso del levulinato de etilo. Para completar esta parte del estudio, se necesitaría realizar ensayos con periodos de exposición más largos.

5. Tras la comparación de valores de ecotoxicidad y toxicidad de los disolventes estudiados con los valores bibliográficos de disolventes tradicionales se ha

podido confirmar que, en ocasiones, los disolventes derivados de la biomasa no presentan mejoras de (eco)toxicidad; sin embargo, algunas propiedades, como pueden ser su baja presión de vapor o su baja inflamabilidad, hacen que su uso sea preferente frente a los disolventes tradicionales.

6. La evaluación de ecotoxicidad y toxicidad realizada ha determinado que el lactato de metilo, el lactato de etilo y el alcohol tetrahidrofurfurílico son los disolventes que menor toxicidad han presentado. Además, las propiedades fisicoquímicas, solubilidad, *c.a.c.* y *log P,* de estos compuestos se relacionan adecuadamente con su efecto tóxico. Por el contrario, el 5-metilfurfural es el disolvente que presentó mayores efectos tóxicos en ambas evaluaciones.

Finalmente, se concluye que este trabajo ha sido el primer estudio en realizar una evaluación completa de la ecotoxicidad, citotoxicidad y neurotoxicidad aguda de tres familias de disolventes derivados de la biomasa encontrando una relación estructura-toxicidad para ellos. A pesar de considerarse que el lactato de metilo, el lactato de etilo y el alcohol tetrahidrofurfurílico son los disolventes con mejores características para ser disolventes verdes, se considera conveniente completar la información realizando estudios de toxicidad crónica y ensayos *in vivo*.

Bibliografía

1. Lancaster M (2014): Green chemistry : an introductory text. RSC Publishing, Cambridge
2. Anastas PT, Williamson TC (1996): Green chemistry: An overview. Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment. Acs Symposium Series, pp. 1-17
3. Anastas PT, Warner JC (2000): Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press, Oxford (England); Toronto
4. Horchani H, Chaabouni M, Gargouri Y, Sayari A (2010): Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: Optimization by response surface methodology. Carbohydrate Polymers 79, 466-474
5. Kerton FM (2009): Alternative solvents for Green Chemistry. RSC Pub, Cambridge
6. Anastas PT, Williamson TC (1996): The green chemistry challenge. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 212, 43-ENVR
7. Horvath IT (2008): Solvents from nature. Green Chemistry 10, 1024-1028
8. Capello C, Fischer U, Hungerbühler K (2007): What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. Green Chemistry 9, 927-934
9. Jessop PG (2011): Searching for green solvents. Green Chem. Green Chemistry 13, 1391
10. Díaz-Álvarez AE, Francos J, Lastra-Barreira B, Crochet P, Cadierno V (2011): Glycerol and derived solvents: new sustainable reaction media for organic synthesis. Chemical communications (Cambridge, England) 47, 6208-27
11. Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014): Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. Chemical Reviews 114, 11060-11082
12. Laborda Grima R, García John E, Recalde Ruiz DL, Instituto Valenciano de Seguridad y Salud en el T (2009): Manual práctico para el manejo del Reglamento REACH. Instituto Valenciano de Seguridad y Salud en el Trabajo - INVASSAT, [Valencia
13. European Chemicals Agency (2011): Funcionamiento de los reglamentos REACH y CLP: resumen del informe de 2011.
14. Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, (2010): Documento de orientación sobre sustancias intermedias. ECHA-2010-G-17-ES.
15. Bus JS, Becker RA (2009): Toxicity Testing in the 21st Century: A View from the Chemical Industry. Toxicological Sciences 112, 297-302
16. Repetto M, Sanz P (1995): Fundamentos de toxicología, Toxicología avanzada. Diaz de Santos, Madrid
17. Andersen ME, Krewski D (2009): Toxicity Testing in the 21st Century: Bringing the Vision to Life. Toxicological Sciences 107, 324-330
18. Krewski D, Andersen ME, Mantus E, Zeise L (2009): Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment. Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis 29, 474-9
19. Reglamento CLP (2009): Clasificación y Etiquetado de sustancias y mezclas conforma al reglamento 1272/2008: UGT FIA Industrias Afines D.L.

20. European parliament (2010): Directives 2013/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used of Scientific Purposes
21. Reglamento 440/2008 (2008): métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) no 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)
22. Smyth DH (1978): Alternatives to animal experiments. Scolar Press, London
23. Herrero O, Pillco A, Gutiérrez R, Cavieres F, Font G, de la Peña de Torres E (2013): Red Iberoamericana de Toxicología y Seguridad Química.
24. Repetto M, Camean A (1995): Toxicología avanzada. Díaz de Santos, Madrid
25. Ramírez P, Mendoza A (2008): Ensayos toxicológicos para la evolución de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. Secretaría de medio ambiente y recursos materiales: Instituto de Ecología, Mexico
26. Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard MA, Lillicrap A, Norberg-King T, Whale G (2010): The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. AQTOX Aquatic Toxicology 97, 79-87
27. Horie Y, Yamagishi T, Koshio M, Iguchi T, Tatarazako N (2017): Lethal and sublethal effects of aniline and chlorinated anilines on zebrafish embryos and larvae. J. Appl. Toxicol. Journal of Applied Toxicology 37, 836-841
28. Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ (2013): Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. Environmental toxicology and chemistry 32, 1768-83
29. Walum E (1998): Acute Oral Toxicity. Environmental health perspectives supplements 106, 497-504
30. Smith PJ, Khan IA, Errington RJ (2007): Cytomics and drug development. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology 71, 349-51
31. Klüver N, Vogs C, Altenburger R, Escher BI, Scholz S (2016): Development of a general baseline toxicity QSAR model for the fish embryo acute toxicity test. CHEM Chemosphere 164, 164-173
32. Bradbury SP, Russom CL, Ankley GT, Schultz TW, Walker JD (2003): Overview of data and conceptual approaches for derivation of quantitative structure-activity relationships for ecotoxicological effects of organic chemicals. ETC Environmental Toxicology and Chemistry 22, 1789-1798
33. Castillo G (2004): Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Mexico
34. Newman MC, Zhao Y (2010): Ecotoxicology nomenclature, Ecotoxicology. Elsevier
35. Arango Varela SS (2012): Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. Revista Facultad Nacional de Salud Publica (Medellin) 30, 75-82

36. Albertini RJ (1999): Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 428, 217-226

37. Hayes AW (1989): Principles and methods of toxicology. Raven Press, New York

38. Calow P (2009): Overview with Observations on Risk Assessment and Management. 461-468

39. Hodson PV (1985): A comparison of the acute toxicity of chemicals to fish, rats and mice. Journal of Applied Toxicology 5, 220-226

40. Owen R, Galloway TS, Hagger JA, Jones MB, Depledge MH (2008): Biomarkers and environmental risk assessment: Guiding principles from the human health field. Marine Pollution Bulletin 56, 613-619

41. Schulte PA (1995): Opportunities for the development and use of biomarkers. Toxicology Letters Toxicology Letters 77, 25-29

42. Stock F, Hoffmann J, Ranke J, Stormann R, Ondruschka B, Jastorff B (2004): Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase, a structure-activity relationship consideration. Green Chemistry 6, 286-290

43. European Comission (2012): Chemicals in the environment and their health implications

44. Seckbach J (2000): Journey to diverse microbial worlds: adaptation to exotic environments. Kluwer Academic, Dordrecht; Boston

45. Onorati F, Mecozzi M (2004): Effects of two diluents in the Microtox (R) toxicity bioassay with marine sediments. Chemosphere 54, 679-687

46. McKee D, Ebert D (1996): The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype on offspring size in *Daphnia magna*. Oecologia 107, 189-196

47. Taylor G, Baird DJ, Soares A (1998): Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna Straus*. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 412-419

48. Zhang L, Baer KN (2000): The influence of feeding, photoperiod and selected solvents on the reproductive strategies of the water flea, *Daphnia magna*. Environmental Pollution 110, 425-430

49. Hanazato T (1998): Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. Chemosphere 36, 1903-1909

50. Abe T, Saito H, Niikura Y, Shigeoka T, Nakano Y (2001): Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. Chemosphere 45, 487-495

51. McClure MM, McIntyre PB, McCune AR (2006): Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio.* JFB Journal of Fish Biology 69, 553-570

52. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008): The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. BRV Biological Reviews 83, 13-34

53. Segner H (2009): Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP 149, 187-95

54. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J (2002): Methods of in vitro toxicology. Food and Chemical Toxicology 40, 193-236

55. Gennari A et al. (2004): Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 50

56. Nota Técnica de Prevención, NTP 487 (1998): Neurotoxicidad : agentes neurotóxicos. Instituto Nacional de Seguridad e higiene

57. Basant N, Gupta S, Singh KP (2015): Predicting acetyl cholinesterase enzyme inhibition potential of ionic liquids using machine learning approaches: An aid to green chemicals designing. Journal of Molecular Liquids 209, 404-412

58. Mineau P (1991): Cholinesterase-inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment. Elsevier, Amsterdam

59. Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V (1996): Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. Alternatives to laboratory animals: ATLA. 24, 499

60. Zucco F, De Angelis I, Testai E, Stammati A (2004): Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. Toxicology in Vitro 18, 153-163

61. Boekelheide K, Andersen ME (2010): A mechanistic redefinition of adverse effects - A key step in the toxicity testing paradigm shift. Altex 27, 243-252

62. Smith MT (1996): The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. Environmental health perspectives 104, 1219-25

63. Nai GA, Oliveira MCd, Tavares GdO, Pereira LFF, Soares NDSL, Silva PG (2015): Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. Brazilian Journal of Anesthesiology 65, 21-26

64. Graziano MJ, Jacobson-Kram D (2015): Genotoxicity and Carcinogenicity Testing of Pharmaceuticals.

65. Yadav P, Bandyopadhyay A, Chakraborty A, Sarkar K (2018): Enhancement of anticancer activity and drug delivery of chitosan-curcumin nanoparticle via molecular docking and simulation analysis. Carbohydrate Polymers Carbohydrate Polymers 182, 188-198

66. Ghosh TK, Prelas MA (2011): Energy resources and systems. Volume 2. Springer, Dordrecht; New York

67. Xie H, Gathergood N (2013): The role of green chemistry in biomass processing and conversion.

68. ISO 11348-3 (2007): Water quality. Determination of the inhibitory effecto of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminiscent bacteria test).

69. Jennings VLK, Rayner-Brandes MH, Bird DJ (2001): Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): A comparison of three commercial systems. Water Research 35, 3448-3456

70. Ribo JM, Rogers F (1990): Toxicity of mixtures of aquatic contaminants using the luminescent bacteria bioassay. Toxicity Assessment 5, 135-152

71. OECD 202: Guideline for testing of chemicals Nº 202 Ds (1984): Acute inmobilisation test and reproduction test

72. OECD 236: Guideline for testing of chemicals Nº 236 ef (2013): Fish embryo toxicity test (FET)

73. Passino DRM, Smith SB (1987): Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in great-lakes fish. Environmental Toxicology and Chemistry 6, 901-907

74. Restrepo Cortés B, Londoño Franco ÁL, Sánchez López JF (2017): Valores de colinesterasa plasmática y eritrocitaria con ácido 6-6-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador. Revista Colombiana de Química 46, 13

75. Sanz P, Repetto M (1995): Implicaciones toxicológicas de enzimas colinesterasas. Ediciones Díaz de Santos SA (Editor), Toxicología avanzada

76. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88, IN1,91-90, IN1,95

77. Rhee IK, Appels N, Luijendijk T, Irth H, Verpoorte R (2003): Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. Phytochemical Analysis 14

78. Abercrombie M, Bellairs R, Curtis ASG, Dunn G (1982): Cell behaviour: a tribute to Michael Abercrombie. Cambridge University Press, Cambridge; New York

79. Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hülsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE (1997): Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. GCC Genes, Chromosomes and Cancer 19, 201-214

80. Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65, 55-63

81. Xu M, McCanna DJ, Sivak JG (2015): Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. Journal of pharmacological and toxicological methods 71, 1-7

82. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales MC (2012): In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. Investigative ophthalmology & visual science 53, 5571-8

83. Kruger NJ (2009): The Bradford Method For Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook, 17-24

84. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 26, 239-57

85. Elmore S (2007): Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic pathology-delaware then new jersey 35, 495-516

86. Häcker G (2000): The morphology of apoptosis. Cell and tissue research 301, 5-17

87. Genuis SJ, Birkholz D, Ralitsch M, Thibault N (2010): Human detoxification of perfluorinated compounds. PUHE Public Health 124, 367-375

88. Thuy Pham TP, Cho CW, Yun YS (2010): Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. WR Water Research 44, 352-372

89. Swatloski RP, Holbrey JD, Rogers RD (2003): Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. Green Chemistry 5, 361-363

90. Lomba L, Giner B, Lopez MC, Aldea L, Lafuente C (2014): Thermophysical Properties of Furfural Compounds. Journal of Chemical and Engineering Data 59, 329-338

91. Lomba L, Giner B, Bandres I, Lafuente C, Rosa Pino M (2011): Physicochemical properties of green solvents derived from biomass. Green Chemistry 13, 2062-2070

92. Lomba L, Giner B, Zuriaga E, Gascon I, Lafuente C (2014): Thermophysical properties of lactates. Thermochimica Acta 575, 305-312

93. Lomba L, Lafuente C, Garcia-Mardones M, Gascon I, Giner B (2013): Thermophysical study of methyl levulinate. Journal of Chemical Thermodynamics 65, 34-41

94. Clary JJ, Feron VJ, van Velthuijsen JA (1998): Safety assessment of lactate esters. Regulatory Toxicology and Pharmacology 27, 88-97

95. Markiewicz M, Maszkowska J, Nardello-Rataj V, Stolte S (2016): Readily biodegradable and low-toxic biocompatible ionic liquids for cellulose processing. RA RSC Advances 6, 87325-87331

96. Ventura SPM, de Morais P, Coelho JAS, Sintra T, Coutinho JAP, Afonso CAM (2016): Evaluating the toxicity of biomass derived platform chemicals. Green Chemistry 18, 4733-4742

97. Bowmer CT, Hooftman RN, Hanstveit AO, Venderbosch PWM, van der Hoeven N (1998): The ecotoxicity and the biodegradability of lactic acid, alkyl lactate esters and lactate salts. Chemosphere 37, 1317-1333

98. Hayes DJ, Ross J, Hayes MHB, Fitzpatrick S (2006): The Biofine Process: production of levulinic acid, furfural and formic acid from lignocellulosic feedstocks, USA. Biorefineries: industrial processes and products. Wiley, Weinheim, 139 – 159

99. Kamm B, Gruber PR, Kamm M (2000): Biorefineries – Industrial Processes and Products, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

100. Campbell GM, Webb C, McKee SL (1999): Cereals: novel uses and processes. Plenum Press, New York 13, 233-239

101. Bozell JJ, Moens L, Elliott DC, Wang Y, Neuenscwander GG, Fitzpatrick SW, Bilski RJ, Jarnefeld JL (2000): Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. Resources, Conservation and Recycling 28, 227-239

102. Tiong YW, Yap CL, Gan S, Yap WSP (2018): Conversion of biomass and its derivatives to levulinic acid and levulinate esters via ionic liquids. Res. Industrial & Engineering Chemistry Research 57, 4749 - 4766

103. Fang Q, Hanna MA (2002): Experimental studies for levulinic acid production from whole kernel grain sorghum. Bioresource Technology 81, 187-192

104. Carpenter CE, Smith JV, Broadbent JR (2011): Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. Meat Science 88, 256-260

105. Bartoli G, Bosco M, Carlone A, Dalpozzo R, Marcantoni E, Melchiorre P, Sambri L (2007): Reaction of dicarbonates with carboxylic acids catalyzed by weak Lewis acids: General method for the synthesis of anhydrides and esters. Synthesis-Stuttgart, 3489-3496

106. Demolis A, Essayem N, Rataboul F (2014): Synthesis and Applications of Alkyl Levulinates. Acs Sustainable Chemistry & Engineering 2, 1338-1352

107. Mao RLV, Zhao Q, Dima G, Petraccone D (2011): New Process for the Acid-Catalyzed Conversion of Cellulosic Biomass (AC3B) into Alkyl Levulinates and Other Esters Using a Unique One-Pot System of Reaction and Product Extraction. Catalysis Letters 141, 271-276

108. Peng LC, Lin L, Li H (2012): Extremely low sulfuric acid catalyst system for synthesis of methyl levulinate from glucose. Industrial Crops and Products 40, 136-144

109. Joshi H, Moser BR, Toler J, Smith WF, Walker T (2011): Ethyl levulinate: A potential bio-based diluent for biodiesel which improves cold flow properties. Biomass & Bioenergy 35, 3262-3266

110. Pena-Tejedor S, Murga R, Sanz MT, Beltran S (2005): Vapor-liquid equilibria and excess volumes of the binary systems ethanol plus ethyl lactate, isopropanol plus isopropyl lactate and n-butanol plus n-butyl lactate at 101.325 kPa. Fluid Phase Equilibria 230, 197-203

111. Zhang J, Liu M, Jin H, Deng L, Xing J, Dong A (2010): In vitro enhancement of lactate esters on the percutaneous penetration of drugs with different lipophilicity. AAPS PharmSciTech 11, 894-903

112. Anonymous (1998): Scientists Solve Solvent Production Puzzle. Industrial paint and powder 74, 12-15

113. Pereira CSM, Silva V, Rodrigues AE (2011): Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes - a review. Green Chemistry 13, 2658-2671

114. Zeitsch KJ (2000): The chemistry and technology of furfural and its many by-products. Volume 13 (Sugar series)

115. Corma A, Iborra S, Velty A (2007): Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. Chemical Reviews 107, 2411-2502

116. Kirk RE, Othmer DF, Kroschwitz JI, Howe-Grant M (1997): Silicon compounds to succinic acid and succinic anhydride. Encyclopedia of chemical technology. Wiley, New York

117. Giordano L, Calabrese R, Davoli E, Rotilio D (2003): Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatographymass spectrometry using isotope dilution. Journal of Chromatography 1017, 141-149

118. Katsuta R, Aoki K, Yajima A, Nukada T (2013): Synthesis of the core framework of the proposed structure of sargafuran. Tetrahedron Letters 54, 347-350

119. Agila A, Barringer S (2013): Effect of adulteration versus storage on volatiles in unifloral honeys from different floral sources and locations. Journal of food science 78, 184-91

120. United States International Trade C (2009): Tetrahydrofurfuryl alcohol from China: investigation no. 731-TA-1046 (review).

121. Cronin M, Madden J (2010): In silico toxicology principles and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge

122. Mackay D (1991): Multimedia environmental models: the fugacity approach. Lewis Publishers, Chelsea, Mich.

123. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL (2017): Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA. 38, 179-192

124. Pasto DJ, Johnson CR, R. Areal G, Ramagosa JT (1981): Determinación de estructuras orgánicas. Reverté, Barcelona

125. Rand GM (1995): Fundamentals of aquatic toxicology : effects, environmental fate, and risk assessment. Taylor & Francis, Washington, D.C.

126. Utembe W, Potgieter K, Gulumian M, Stefaniak AB (2015): Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. Part. Fibre Toxicol. Particle and Fibre Toxicology 12

127. Tanford C (1974): Theory of micelle formation in aqueous-solutions. Journal of Physical Chemistry 78, 2469-2479

128. Brito RO, Marques EF, Silva SG, do Vale ML, Gomes P, Araujo MJ, Rodriguez-Borges JE, Rosa Infante M, Teresa Garcia M, Ribosa I, Pilar Vinardell M, Mitjans M (2009): Physicochemical and toxicological properties of novel amino acid-based amphiphiles and their spontaneously formed catanionic vesicles. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 72, 80-87

129. Zuriaga E, Lomba L, Royo FM, Lafuente C, Giner B (2014): Aggregation behaviour of betablocker drugs in aqueous media. New Journal of Chemistry 38, 4141-4148

130. Lomba L, Giner B, Zuriaga E, Moya J, Lafuente C (2013): Self-aggregation of liquids from biomass in aqueous solution. The Journal of Chemical Thermodynamics 66, 131-136

131. Stanley M (2007): Introduccion a la quimica ambiental/ Introduction to Environmental Chemistry. Reverte Editorial Sa

132. Mohsen-Nia M, Ebrahimabadi AH, Niknahad B (2012): Partition coefficient n-octanol/water of propranolol and atenolol at different temperatures: Experimental and theoretical studies. Journal of Chemical Thermodynamics 54, 393-397

133. Hansch C (1969): Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. Acc. Chem. Res. Accounts of Chemical Research 2, 232-239

134. Trejo Muñoz CR, Mancilla Percino T, Mera Jiménez E, Correa-Basurto J, Trujillo Ferrara JG (2013): Partition coefficient determination of a series of isoindolines-2-substituted and its correlation with their antiproliferative activity on HeLa cells. Medicinal Chemistry Research 22, 4039-4045

135. Delgado Cirilo A, Minguillón Llombart C, Joglar Tamargo J (2003): Introducción a la química terapeútica.

136. Sah PPT, Ma SY (1930): Levulinic acid and its esters. Journal of the American Chemical Society 52, 4880-4883

137. Schuette HA, Cowley MA (1931): Levulinic acid. II. The vapor pressures of its alkyl esters (C-1-C-6). Journal of the American Chemical Society 53, 3485-3489

138. Cox GJ, Dodds ML (1933): Industrial uses for cane sugar II Properties of alkyl esters of levulinic acid. Industrial and Engineering Chemistry 25, 967-968

139. Guerrero H, Lafuente C, Royo F, Lomba L, Giner B (2011): P rho T Behavior of Several Chemicals from Biomass. Energy & Fuels 25, 3009-3013

140. Rehberg CE, Dixon MB (1950): n-Alkyl Lactates and their Acetates. Journal of the American Chemical Society 72, 1918-1922

141. Sanz MT, Calvo B, Beltran S, Cabezas JL (2002): Vapor-liquid equilibria at (33.33, 66.66, and 101.33) kPa and densities at 298.15 K for the system methanol plus methyl lactate. Journal of Chemical and Engineering Data 47, 1003-1006

142. Aparicio S (2007): Computational study on the properties and structure of methyl lactate. Journal of Physical Chemistry A 111, 4671-4683

143. Chen JT, Chu HP (2007): Densities and viscosities for binary mixtures of ethyl lactate with methacrylic acid, benzyl methacrylate, and 2-hydroxyethyl methacrylate at (298.15, 308.15, and 318.15) K. Journal of Chemical and Engineering Data 52, 650-654

144. Aparicio S, Halajian S, Alcalde R, Garcia B, Leal JM (2008): Liquid structure of ethyl lactate, pure and water mixed, as seen by dielectric spectroscopy, solvatochromic and thermophysical studies. Chemical Physics Letters 454, 49-55

145. Aparicio S, Alcalde R (2009): The green solvent ethyl lactate: an experimental and theoretical characterization. Green Chemistry 11, 65-78

146. Sako T, Sugeta T, Nakazawa N, Otake K, Sato M, Ishihara K, Kato M (1995): High pressure vapor-liquid and vapor-liquid-liquid equilibria for systems containing supercritical carbon dioxide, water and furfural. Fluid phase equilibria. 108, 293

147. Senol A, Cehreli S, Ozmen D (2005): Phase Equilibria for the Ternary Liquid Systems of (Water + Tetrahydrofurfuryl Alcohol + Cyclic Solvent) at 298.2 K. Journal of chemical and engineering data. 50, 688

148. Grushova EI, Yusevich AI (2007): Extraction properties of blends of tetrahydrofurfuryl alcohol with acetone, ethanol, and ethylene glycol. Pet. Chem. Petroleum Chemistry 47, 421-424

149. Tischer RG, Fellers CR, Doyle BJ (1942): The Nontoxicity of Levulinic Acid*. Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.) 31, 217-220

150. MacPhee C, Ruelle R (1969): Lethal effects of 1888 chemicals upon four species of fish from western North America. U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Yankton, South Dakota

151. Lomba L, Muniz S, Pino MR, Navarro E, Giner B (2014): Ecotoxicity studies of the levulinate ester series. Ecotoxicology 23, 1484-1493

152. Bluhm K, Seiler TB, Anders N, Klankermayer J, Schaeffer A, Hollert H (2016): Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. Science of the Total Environment 566, 786-795

153. Johanningmeier U, Howell SH (1984): Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein messenger-rna accumulation in chlamydomonas-reinhardi - possible involvement of chlorophyll synthesis precursors. Journal of Biological Chemistry 259, 3541-3549

154. Viboud S, Papaiconomou N, Cortesi A, Chatel G, Draye M, Fontvieille D (2012): Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on *Vibrio fischeri:* a systematic study. Journal of Hazardous Materials Journal of Hazardous Materials 215-216, 40-48

155. Mutalib MIA, Ghanem OB (2017): Ecotoxicity of Ionic Liquids Towards *Vibrio fischeri*: Experimental and QSAR Studies. Chemosphere 170, 242-250

156. Larson J, Frost P, Lamberti G (2007): Variable Toxicity of Ionic Liquid Forming Chemicals to *Lemna minor* and the Influence of Dissolved Organic Matter. Environmental Toxicology and Chemistry 27, 676-681

157. Garcia JI, Pires E, Aldea L, Lomba L, Perales E, Giner B (2015): Ecotoxicity studies of glycerol ethers in *Vibrio fischeri:* checking the environmental impact of glycerol-derived solvents. Green Chemistry 17, 4326-4333

158. Perales E, Garcia CB, Lomba L, Giner B, Garcia JI, Pires E, Sancho MC, Navarro E (2017): Comparative ecotoxicity study of glycerol-biobased solvents. Environmental Chemistry 14, 370-377

159. Perales E, García JI, Pires E, Aldea L, Lomba L, Giner B (2017): Ecotoxicity and QSAR studies of glycerol ethers in *Daphnia magna.* Chemosphere. 183, 277-285

160. Hessov I (1975): Toxicity of 5-hydroxymethylfurfural and furfural to *Daphnia magna*. Acta Pharmacologica Et Toxicologica 37, 94-96

161. Bringmann G, Kuhn R (1982): Results of toxic action of water pollutants on *Daphnia magna straus* tested by an improved standardized procedure. Zeitschrift Fur Wasser Und Abwasser Forschung-Journal for Water and Wastewater Research 15, 1-6

162. Deneer JW, Seinen W, Hermens JLM (1988): The acute toxicity of aldehydes to the guppy. Aquatic Toxicology 12, 185-192

163. Call DJ, Geiger DL (1992): Subchronic toxicities of industrial and agricultural chemicals to fathead minnows (*Pimephales promelas*). Center for Lake Superior Environmental Studies, vol. 1. University of Wisconsin-Superior, USA

164. National Institute of Technology and Evaluation (2014): Chemical Risk Information Platform (CHRIP)

165. Alabaster, J.S. (1969): Survival of Fish in 164 Herbicides, Insecticides, Fungicides, Wetting Agents and Miscellaneous Substances. International Pest Control, pp. 29-35

166. Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T (2013): Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. BioMed Research International 2013, 1-8

167. Piper PW (1999): Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. Free Radical Biology and Medicine 27, 1219-1227

168. Guo ZP, Olsson L (2016): Physiological responses to acid stress by *Saccharomyces cerevisiae* when applying high initial cell density. FEMS yeast research 16

169. Ferrer NB, Prats LG, Boliart JC (2014): Degreasing compositions derived from levulinic acid (a compound obtainable from biomass) and process for degreasing metal surfaces

170. Sebastian H, Kerstin B, Julia B, Philipp M, Nico A, Andreas S, Thomas-Benjamin S, Henner H (2016): Microscale In Vitro Assays for the Investigation of Neutral Red Retention and Ethoxyresorufin-O-Deethylase of Biofuels and Fossil Fuels. PLOS ONE 11

171. Radosevic K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srcek V, Grgas D, Landeka Dragicevic T, Radojcic Redovnikovic I (2015): Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. YEESA Ecotoxicology and Environmental Safety 112, 46-53

172. Wu S, Zeng L, Wang C, Yang Y, Zhou W, Li F, Tan Z (2018): Assessment of the cytotoxicity of ionic liquids on Spodoptera frugiperda 9 (Sf-9) cell lines via in vitro assays. Journal of hazardous materials 348, 1-9

173. Peropadre A, Fernandez Freire P, Perez Martin JM, Hazen MJ, Herrero O (2015): Endoplasmic reticulum stress as a novel cellular response to di (2-ethylhexyl) phthalate exposure. Toxicol. Vitro Toxicology in Vitro 30, 281-287

174. Zhang X, Zhang K (2012): Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Lipid Droplet Formation and Type II Diabetes. Biochemistry research international 2012

175. Rajakumar S, Nachiappan V (2017): Lipid droplets alleviate cadmium induced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. TX Toxicology Research 6, 30-41

176. Rau MH, Calero P, Lennen RM, Long KS, Nielsen AT (2016): Genome-wide Escherichia coli stress response and improved tolerance towards industrially relevant chemicals. Microbial Cell Factories 15

177. Arbetslivsinstitutet, Kriteriegruppen för hygieniska g (1999): Consensus report for some lactate esters : June 2, 1999. Scientific basis for Swedish occupational standards - 20, 75-82

178. Clary JJ, Feron VJ, van Velthuijsen JA (2001): Evaluation of Potential Neurotoxic Effects of Occupational Exposure to (L)-Lactates. Regulatory Toxicology and Pharmacology 33, 21-28

179. Gupta GD, Misra A, Agarwal DK (1991): Inhalation toxicity of furfural vapours: An assessment of biochemical response in rat lungs. JAT Journal of Applied Toxicology 11, 343-347

180. Laurent A, Mottu F, Jordan O, Rüfenacht DA, Doelker E (2007): Cardiovascular effects of selected water-miscible solvents for pharmaceutical injections and embolization materials: a comparative hemodynamic study using a sheep model. PDA journal of pharmaceutical science and technology

181. Mottu F, Stelling M-J, Rüfenacht DA, Doelker E (2001): Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection. PDA journal of pharmaceutical science and technology

182. Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Ema M (2008): Screening study for reproductive and developmental toxicity of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. Toxicology Letters Toxicology Letters 180, S145-S146

183. European Food Safety (2011): Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 13, Revision 2 (FGE.13Rev2): Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14. EFSA Journal 9

184. Chai WM, Liu X, Hu YH, Feng HL, Jia YL, Guo YJ, Zhou HT, Chen QX (2013): Antityrosinase and antimicrobial activities of furfuryl alcohol, furfural and furoic acid. International Journal of Biological Macromolecules 57, 151-5

185. Sujatha PS (2008): Monitoring cytotoxic potentials of furfuryl alcohol and 2-furyl methyl ketone in mice. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 46, 286-92

186. Irwin RD, Chou BJ, Mellick PW, Miller RA, Mahler J, Roycroft J (1997): Toxicity of Furfuryl Alcohol to F344 Rats and B6C3F Mice Exposed by Inhalation. JAT Journal of Applied Toxicology 17, 159-169

187. Skalska-Hilgier E (1982): Effect of intoxication with furfural on rat tissue aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Bromatol Chem Toksykol, pp. 229-300

188. Sullivan JB, Krieger GR (2001): Clinical environmental health and toxic exposures. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

189. Sujatha PS (2008): Response of Human Lymphocytes In Vitro to Two Dietary Furans, Furfuryl Alcohol and 2-Furyl Methyl Ketone. Tokyo, Journal of health science 54, 66-71

190. Cary R, World Health O (2000): 2-furaldehyde. International Programme on Chemical Safety; Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. WHO, Geneva

191. European Food Safety (2004): Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to Furfural and Furfural Diethylacetal. EFS2 EFSA Journal 2

192. Gomez-Arroyo S, Souza V (1985): In vitro and occupational induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes with furfuryl alcohol and furfural. Mutation research 156, 233-8

193. Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S (2008): Toxicity assessment of organic pollutants: Reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. Toxicology in Vitro 22, 1806-1813

194. Yen JH, Lin KH, Wang YS (2002): Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organisms. Ecotoxicology and Environmental Safety 52, 113-116

195. Pawlisz AV, Peters RH (1995): Effects of sublethal exposure on lethal body burdens of narcotic organic chemicals in *Daphnia magna*. Environmental Science & Technology 29, 613-621

196. Scholz S, Ortmann J, Klüver N, Léonard M (2014): Extensive review of fish embryo acute toxicities for the prediction of GHS acute systemic toxicity categories. Regulatory toxicology and pharmacology 69, 572-9

197. Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009): Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP. 149, 196

198. Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczobutt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B (2004): Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute Vibrio fischeri and WST-1 cell viability assays. Ecotoxicology and Environmental Safety 58, 396-404

199. Stolte S, Arning J, Bottin-Weber U, Muller A, Pitner WR, Welz-Biermann U, Jastorff B, Ranke J (2007): Effects of different head groups and functionalised side chains on the cytotoxicity of ionic liquids. Green Chemistry 9, 760-767

200. Jørgensen SE, Fath BD (2010): Ecotoxicology: a derivative of Encyclopedia of ecology.

Anexos