



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**Estudio ecotoxicológico mediante ensayos de  
bioluminiscencia de los fármacos  
Edaravone y Paracetamol**

**Autor:**

**Álvarez Escalante, Iván Alejandro**

**Tutor 1:**

**Irusta Mata, Rubén**

**Tutor 2:**

**Martínez Páramo, Sonia**

**Dpto. Ingeniería Química y  
Tecnologías del Medio Ambiente**

**Valladolid, Noviembre de 2018.**





## Resumen

Actualmente, la presencia de compuestos activos farmacéuticos (PhAC's) en la naturaleza ha manifestado ser un grave problema medioambiental, debido a su ecotoxicidad a muy bajas concentraciones y su elevado consumo en hogares y centros sanitarios.

Los ensayos ecotoxicológicos son un modo de valorar el impacto de estos compuestos. En el presente trabajo, utilizando las bacterias *Vibrio fischeri*, se ha calculado el grado de ecotoxicidad, medido como concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ), del nuevo fármaco Edaravone y del ampliamente consumido Paracetamol, resultando para el primero de 170,10 mg/L y para el segundo de 697,34 mg/L, tras 15 minutos de exposición. Asimismo, se ha evidenciado experimentalmente la existencia de hormesis ecotoxicológica en una mezcla de ambos compuestos.

Por otra parte, se ha valorado la ecotoxicidad de Edaravone y Paracetamol en varios organismos con ayuda de un software de predicción que se fundamenta en relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) y se ha realizado una aproximación al mecanismo de acción de ambos fármacos.

Asimismo, se han determinado experimentalmente las  $EC_{50}$  de mezclas binarias de Paracetamol/Edaravone, y posteriormente se han estimado utilizando modelos predictivos tradicionales como el CA (Concentration Addition) y el IA (Independent Action), y el modelo Integrado, IAI (Integrated Addition and Interaction).

Finalmente, se ha propuesto un nuevo modelo basado en la ecuación de van Laar y se ha llevado a cabo una predicción de la  $EC_{50}$  de diferentes mezclas binarias Paracetamol/Edaravone mediante un modelo de regresión lineal múltiple, ICIM (Integrated Concentration Addition with Independent Action).

**Palabras clave:** Ecotoxicidad,  $EC_{50}$ , Edaravone, Paracetamol, relación estructura-actividad, QSAR, mezclas binarias.

## Abstract

Nowadays, the presence of Pharmaceutical Active Compounds (PhAC's) in the environment has proven to be a serious environmental issue because of their ecotoxicity at very low concentrations and high consumption in households and health centres.

Ecotoxicological tests are widely used to assess the impact of these compounds. In this work, *Vibrio fischeri* bacteria have been used to measure the degree of ecotoxicity of the new drug Edaravone and the widely consumed Acetaminophen, as the half maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ), resulting values of 170.10 mg/L and 697.34 mg/L, respectively, after 15 minutes of exposure. In addition, the presence of ecotoxicological hormesis in a mixture of both compounds has been demonstrated.

Alternatively, ecotoxicity of Edaravone and Acetaminophen has been evaluated in several organisms with a predictive software based on quantitative structure-activity relationships (QSAR) and an approximation of the mechanism of action of both drugs has been suggested.

Moreover, the  $EC_{50}$  of binary mixtures Acetaminophen/Edaravone have been experimentally determined, and also forecasted using two traditional predictive models, the CA (Concentration Addition) and the IA (Independent Action), and an integrated model, IAI (Integrated Addition and Interaction).

Finally, a new model based on the van Laar equation has been proposed and a forecasting of the  $EC_{50}$  of several binary mixtures of Acetaminophen/Edaravone using a multiple linear regression model, ICIM (Addition of Integrated Concentration with Independent Action) has been performed.

**Keywords:** Ecotoxicity,  $EC_{50}$ , Edaravone, Acetaminophen, structure-activity relationship, QSAR, binary mixtures.



## Índice de contenidos

1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. Materiales y métodos.....	7
3.1. Fármacos .....	7
3.1.1. Edaravone.....	7
3.1.2. Paracetamol .....	7
3.2. Análisis de ecotoxicidad mediante ensayos de bioluminiscencia. ....	8
3.2.1. Materiales y reactivos .....	8
3.2.2. Métodos.....	9
3.2.3. Cálculos y errores asociados al método.....	11
3.3. Estimación de ecotoxicidad mediante el software ECOSAR™.....	14
3.4. Estimación de la concentración efectiva media (EC <sub>50</sub> ) en mezclas binarias .....	16
3.4.1. Introducción a los modelos predictivos en mezclas.....	16
3.4.2. Modelo CA (Concentration Addition).....	17
3.4.3. Modelo IA (Independent Action).....	18
3.4.4. Modelo IAI (Integrated Addition and Interaction).....	19
3.4.5. Modelo van Laar a partir de coeficientes de “actividad ecotoxicológica” .....	20
3.4.6. Modelo ICIM (Integrated Concentration Addition with Independent Action) .....	21
4. Resultados y discusión.....	25
4.1. Ecotoxicidad individual de Edaravone y Paracetamol. ....	25
4.1.1. Determinaciones mediante Microtox®.....	25
4.1.2. Estimación mediante ECOSAR™.....	29
4.2. Ecotoxicidad de mezclas binarias Paracetamol/Edaravone .....	32
4.2.1. Determinación experimental mediante Microtox® .....	32
4.2.2. Estimaciones mediante los Modelos CA, IA e IAI.....	36



4.2.3. Estimación por ajuste de datos experimentales con el modelo tipo van Laar .....	40
4.2.4. Estimación por ajuste de datos experimentales con el modelo ICIM	42
5. Conclusiones .....	45
6. Referencias bibliográficas .....	47
7. Anexos.....	53
A.1. Ensayo Microtox® “Test Básico”. .....	53
A.2. Hoja de resultados de ECOSAR™. .....	55
A.3. Resultados del estudio ecotoxicológico mediante el ensayo de bioluminiscencia. ....	56
A.4. Resultados asociados a los modelos CA, IA e IAI. ....	64
A.5. Cálculos y errores asociados a la estimación mediante el modelo tipo van Laar.....	66
A.6. Resultados asociados al modelo ICIM y a su validación.....	68

## 1. Introducción

Hoy en día, la presencia de compuestos activos farmacéuticos (PhAC's) en la naturaleza ha demostrado ser un grave problema medioambiental, debido a su capacidad de inducir efectos perjudiciales a muy bajas concentraciones tanto en humanos como en la vida salvaje. Por otro lado, su elevado consumo en hogares y centros sanitarios supone un añadido a este inconveniente (Ebele *et al.*, 2017).

Cuando hablamos de toxicidad nos referimos a la capacidad de una sustancia química de inducir efectos dañinos en un organismo. En cambio, cuando nos referimos a la ecotoxicidad, ésta mide el efecto tóxico resultante de la presencia de un compuesto químico en un ecosistema.

Normalmente describimos la ecotoxicidad en función del tiempo de exposición a la sustancia dañina. Se distinguen dos clases, por un lado, la ecotoxicidad aguda, la cual representa los efectos perjudiciales en un organismo durante un tiempo de exposición a un compuesto no mayor de 15 días, por otro, la ecotoxicidad crónica, la cual cuantifica los efectos en un tiempo que puede oscilar entre 15 días y años (Peake *et al.*, 2016).

Los ensayos estándar de ecotoxicidad son un modo de valorar el efecto producido de los fármacos en organismos tales como algas, crustáceos o peces. Sin embargo, también se utilizan microorganismos como bacterias. Un ejemplo es el ensayo de inhibición de la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*, el cual es ampliamente aplicado (Ortiz *et al.*, 2014). Así, en el presente trabajo se han realizado bioensayos de ecotoxicidad de fármacos por medio de este microorganismo y el equipo Microtox<sup>®</sup>, ensayo que ha sido ampliamente validado por poseer una sensibilidad igual o superior a los test que incluyen organismos de mayor complejidad (Abbas *et al.*, 2018).

Por otro lado, es preciso disponer de valores numéricos que nos den una idea del grado de contaminación. Por tanto, existen parámetros ecotoxicológicos, como la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>), que nos ayudan en ese propósito.

El ensayo Microtox<sup>®</sup> posee innumerables aplicaciones, ya que es posible analizar además de los PhAC's, un amplio rango de analitos, como pueden ser: contaminantes atmosféricos, plaguicidas o nanopartículas.

Si atendemos al tipo de muestra a evaluar, se utiliza principalmente en dos campos:

- Efluentes industriales. Microtox® ha sido validado como un test eficiente para analizar efluentes de múltiples industrias, ya sean del campo farmacéutico, alimentario, textil, etc.
- Evaluación del rendimiento de procesos de eliminación de contaminantes en las aguas residuales.

Una revisión más exhaustiva de las aplicaciones del ensayo Microtox® se encuentra en Abbas *et al.* (2018).

Enfocándonos en los compuestos activos farmacéuticos (PhAC's), investigadores de numerosos países han detectado decenas de estas sustancias y sus metabolitos en aguas residuales, superficiales, subterráneas, etc. Esto significa que los fármacos no se eliminan en los procesos de tratamiento y que tampoco se degradan en el medio ambiente (Hereber, 2002).

Como consecuencia, se ha considerado conveniente evaluar la ecotoxicidad del nuevo fármaco Edaravone o Radicava® (Fig. 3.1), del cual no se tiene constancia de que existan estudios relacionados.

Edaravone es un potente inhibidor de radicales libres y es capaz de retrasar la disfunción en pacientes que padecen esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Fue aprobado en 2017 por la FDA (Food and Drug Administration), agencia perteneciente al gobierno de los Estados Unidos y que es responsable del control de los alimentos y medicamentos. (NCBI, 2018)

Por otra parte, en España, el Paracetamol o Acetaminofén (Fig. 3.1) es el compuesto farmacéutico más prescrito. Su consumo en el año 2010 fue de 1066 t/año, casi 5 veces más que el segundo en el ranking, el Ibuprofeno, con 219 t/año (Ortiz *et al.*, 2013).



Figura 3.1. Fármacos Radicava® (Edaravone) y Paracetamol (Acetaminofén).

Asimismo, tanto Edaravone como Paracetamol poseen estructuras moleculares similares, como veremos en posteriores apartados.

Para el caso del Paracetamol disponemos de estudios ecotoxicológicos realizados previamente, como, por ejemplo, el de Ortiz *et al.*, 2014. Así pues, una vez conseguidos los valores de ecotoxicidad para el Edaravone estaremos en condiciones de comparar la ecotoxicidad de ambos fármacos.

Finalmente, se ha juzgado preciso estudiar la ecotoxicidad conjunta de Edaravone y Paracetamol formando mezclas binarias, pues, como el segundo es el fármaco más prescrito en España, es muy probable que sea suministrado de manera conjunta con el Edaravone. Además, el efecto conjunto de los dos sobre los organismos podría no ser el esperado teóricamente.



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

- Realizar un estudio de ecotoxicidad con *Vibrio fischeri* del fármaco Edaravone y evaluar su impacto en los medios acuáticos.
- Realizar un estudio ecotoxicológico de Edaravone en presencia del fármaco Paracetamol y valorar el posible efecto sinérgico de la mezcla binaria.

### 2.2. Objetivos específicos.

- Llevar a cabo ensayos de ecotoxicidad por medio de cuantificación de bioluminiscencia con las bacterias marinas *Vibrio fischeri*.
- Predecir la ecotoxicidad de Edaravone y Paracetamol sobre otros organismos mediante el software EPI Suite™ (US EPA, 2012).
- Predecir efectos ecotoxicológicos de mezclas binarias Edaravone-Paracetamol por medio de dos modelos referenciados en la bibliografía, CA (Concentration Addition) e IA (Independent Action) (Faust *et al.*, 2003). Evidenciar si el modelo IAI (Integrated Addition and Interaction) (Rider *et al.*, 2005) mejora la predicción de los dos anteriores.
- Proponer un nuevo modelo de predicción apoyado en una ecuación tipo van Laar.
- Aplicar un modelo propuesto por Qin *et al.* (2011), que combina los modelos CA e IA y que está basado en una regresión lineal múltiple, ICIM (Integrated Concentration Addition with Independent Action).



### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Fármacos

##### 3.1.1. Edaravone

Edaravone posee el nombre químico de 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, se presenta como un compuesto cristalino de color blanco, conserva un punto de fusión de 129,7°C, es soluble en algunos compuestos orgánicos y ligeramente en agua.

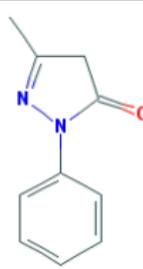
Una vez suministrado este medicamento por vía intravenosa, el 1% de la dosis es excretada sin ninguna alteración y entre el 71 y 79,9% es eliminado en forma de sus metabolitos, la mayoría conjugados glucurónidos y sulfatos (Cruz, 2018).

##### 3.1.2. Paracetamol

El Paracetamol o Acetaminofén, se trata de un compuesto que cuenta con propiedades analgésicas y antipiréticas.

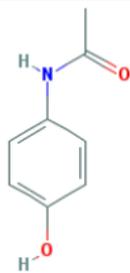
Su nombre químico es N-(4-hidroxifenil) acetamida; a temperatura ambiente se presenta en forma de sólido blanco y cristalino, y posee un punto de fusión de 169°C y es soluble en agua.

Tabla 3.1. Características principales de los fármacos.

Nombre común	Uso terapéutico	Estructura y fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad en agua* (mg/L)
Edaravone	Tratamiento para la ELA	 <chem>Cc1nc(cc1=O)Nc2ccccc2</chem> $C_{10}H_{10}N_2O$	174,20	<1000

\* A 23 °C

Tabla 3.1. Características principales de los fármacos (Cont.)

Nombre común	Uso terapéutico	Estructura y fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad en agua* (mg/L)
Paracetamol	Analgésico y antipirético	 $C_8H_9NO_2$	151,16	14 000

\* A 23 °C

Tal y como adelantamos en la introducción, las estructuras moleculares de los fármacos son muy similares, especialmente en lo que se refiere a los grupos funcionales. Por ejemplo, los dos poseen al menos un átomo de nitrógeno, grupo carbonilo y anillo bencénico. Asimismo, las dos masas moleculares son muy parecidas.

### 3.2. Análisis de ecotoxicidad mediante ensayos de bioluminiscencia.

#### 3.2.1. Materiales y reactivos

A continuación, se incluyen una lista de los materiales utilizados:

- Luminómetro Microtox®, Microbics Corp. Carlsbad, CA, USA.
- Cubetas para el análisis.
- Ordenador provisto del programa MicrotoxOmni™ (Software para Windows® 95/98/NT)
- Micropipetas de volumen variable (2-20 µL y 100-1000 µL) y con puntas desechables.
- Balanza analítica
- Tubos de ensayo de tapa roscada de 50 mL para almacenar las muestras y soluciones de trabajo.
- Refrigerador ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ) y congelador ( $\approx -20^\circ\text{C}$ ).
- Reactivo: bacterias *Vibrio fischeri* liofilizadas y congeladas.
- Agua desionizada ultrapura (Milli-Q®) para la solución de reconstitución y para preparar muestras.
- Solución de ajuste osmótico (AOS): NaCl al 22% (w/v) en agua Milli-Q
- Solución de diluyente: NaCl al 2% (w/v) en agua Milli-Q

- Soluciones patrón:
  - o Sulfato de Zinc heptahidratado (50 mg/L)
  - o Triclosan, certified reference material, TraceCERT® (Ref. 93453 SIGMA-ALDRICH) (4,8 mg/L)
- Reactivos problema:
  - o 1-Fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona (Edaravone): Pureza 99% Sigma-Aldrich Quimica, S.L. (Ref. M70800 ALDRICH)
  - o Acetaminophen (Paracetamol): BioXtra, pureza 99% Sigma-Aldrich Quimica, S.L. (Ref. A7085 SIGMA-ALDRICH)

El objetivo de emplear soluciones de sulfato de zinc y triclosán es para comprobar el adecuado funcionamiento del equipo y la pericia del analista (Irusta *et al.*, 2011), puesto que la ecotoxicidad de ambas soluciones es ya conocida. En la Tabla A.3.1 y A.3.2 de los Anexos se recogen estos resultados.

Es preciso tener presente que el propio equipo se encarga de controlar la temperatura del ensayo, que debe ser de 5°C para la cubeta del reactivo y 15°C para el resto.

Por otro lado, las bacterias *Vibrio fischeri* (Modern Water Inc. USA, Ref. AZF686018A), se han almacenado liofilizada entre -20°C y -25°C, con el objetivo de conservar su actividad celular.

Por último, el papel de las disoluciones de NaCl (2% y 22% w/v en agua MilliQ) es de servir como medio salino y de equilibrio osmótico, respectivamente.

### 3.2.2. Métodos.

El ensayo de bioluminiscencia se trata de una técnica basada en el estudio de la variación de la luz emitida por una bacteria marina bioluminiscente de nombre *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*), la cual es extremadamente sensible a un amplio abanico de compuestos tóxicos. Al ponerse en contacto con éstos, la bacteria responde habitualmente reduciendo su luminiscencia, es decir, la intensidad de luz emitida disminuye cuando aumenta la concentración de la sustancia tóxica.

En el desarrollo de este TFG, se ha utilizado el ensayo Microtox®, diseñado por la empresa Strategic Diagnostic Inc. de AZUR Environmental, siguiendo el procedimiento recomendado por esta empresa (norma ISO 11348-3), además del manual de usuario. En la Figura 3.2 se muestra una fotografía del luminómetro empleado.



Figura 3.2. Equipo Microtox® (Fuente: <http://www.instru.es>)

Entre las ventajas de este procedimiento están su fiabilidad, rapidez, bajo coste y su elevada sensibilidad. Además, el equipo ocupa un espacio mínimo y requiere una cantidad exigua de muestra. Asimismo, no hay que olvidar que al trabajar con microorganismos evitamos los problemas éticos derivados de los experimentos con seres vivos de mayor complejidad.

Es importante señalar que todos los análisis se han efectuado para cinco concentraciones y como mínimo por duplicado. Esto último con el objetivo de certificar la reproducibilidad y obtener intervalos de confianza dentro de unos límites admisibles.

El nivel de ecotoxicidad se determina a partir de la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de la sustancia objeto de ensayo que causa una disminución en la luminosidad del 50%. Ésta y otras cuestiones aparecen detalladas en el apartado de cálculos.

A la hora de preparar las disoluciones, partimos de una solución madre con una concentración tal que el  $EC_{50}$  esté dentro de los límites que marcan la solución más diluida y la más concentrada. Es necesario tener en cuenta: 1) que la concentración mayor no será la de la muestra madre, ya que ésta se diluye en un 45% al añadir las disoluciones de NaCl, y 2) que no siempre usamos la misma solución madre, por lo tanto, en las gráficas se observarán más de 5 concentraciones diferentes. El cambio de solución madre en algunos ensayos se debe al desconocimiento de la solubilidad en agua del fármaco Edaravone, que obligó a tantear al preparar sus soluciones.

En el Anexo A.1 se detallan los pasos tomados a la hora de preparar las 5 concentraciones de fármacos antes referidas y su posterior análisis en el luminómetro.

Con relación a calcular las concentraciones de trabajo, el programa MicrotoxOmni™ nos ofrece el grado de dilución de cada muestra, por lo que

una vez fijada la concentración de la solución madre, el programa establece las concentraciones de las demás muestras.

Finalmente, como se ha comentado en la introducción, en el caso del Paracetamol contamos con la ventaja de que ya se han realizado estudios de la ecotoxicidad previamente (Ortiz *et al.*, 2014).

### 3.2.3. Cálculos y errores asociados al método.

Para determinar la variación de la bioluminiscencia de las bacterias *Vibrio fischeri* en presencia de sustancias ecotóxicas, en primer lugar, se halla la variación relativa de intensidad lumínica emitida por las bacterias,  $\Gamma$ , para cada concentración y tiempo de exposición al compuesto ( $t$ ), que se define (Ecuación [3.1]) como la relación entre la intensidad de luz perdida y la luz emitida,  $I_t$ , (medida en unidades de luminiscencia) para un instante dado (5 minutos y 15 minutos), tal y como se establece en el procedimiento de Microtox® para el test básico, (Anexo A.1).

$$\Gamma = \frac{BR \cdot I_0 - I_t}{I_t} \quad [3.1]$$

Donde el término BR es el cociente entre la intensidad en el blanco (solución en ausencia de sustancia tóxica) y la intensidad inicial,  $I_0$ . El motivo por el que introducimos este factor de corrección es para tener en cuenta la reducción de luz por causas naturales a lo largo del ensayo.

Con la expresión [3.2] se puede definir el efecto ecotóxico (E) del contaminante sobre la bioluminiscencia de las bacterias en función del parámetro  $\Gamma$ :

$$E(\%) = \frac{BR \cdot I_0 - I_t}{BR \cdot I_0} \cdot 100 = \frac{\Gamma}{1 + \Gamma} \cdot 100 \quad [3.2]$$

Como se ha mencionado, la concentración efectiva media  $EC_{50}$  es la concentración de sustancia ecotóxica que reduce la bioluminiscencia de las bacterias a un 50% con respecto a la inicial, lo que es equivalente a decir que  $\Gamma=1$ .

Por otro lado, una vez obtenidos los resultados de  $\Gamma(C)$ , se pueden linealizar estos resultados de  $\Gamma$  vs C de ecotóxico mediante una transformación logarítmica, y representar los datos de  $\log \Gamma$  vs  $\log [C]$ , obteniendo la recta de ajuste [3.3].

$$\log \Gamma = A \cdot \log [C] + B \quad [3.3]$$

Si en [3.3] despejamos la concentración cuando  $\Gamma = 1$  obtenemos la concentración efectiva media,  $EC_{50}$ , que viene dada por la ecuación [3.4].

$$EC_{50} = 10^{-B/A} \quad [3.4]$$

Una vez que disponemos de los valores de ecotoxicidad a través de los valores de la concentración efectiva media  $EC_{50}$ , se ha procedido a clasificar a los fármacos según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos\* (GHS - *Global Harmonized System*). Las categorías son las siguientes:

- a) Altamente tóxico:  $EC_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$
- b) Tóxico:  $1 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50} \leq 10 \text{ mg L}^{-1}$
- c) Dañino para organismos acuáticos:  $10 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50} \leq 100 \text{ mg L}^{-1}$
- d) No tóxico:  $EC_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$

(\*) Clasificación adaptada del texto de las Naciones Unidas del año 2011.

Por último, existe un parámetro llamado Unidades de Toxicidad (UT) definido por la expresión [3.5], proporcionado por el software de análisis de MicrotoxOmni™, que es muy útil para detectar una posible desviación de los valores de toxicidad habituales cuando existe un gran volumen de muestras, como puede ser el caso de una planta de tratamiento de aguas residuales. En la Tabla 3.2 se muestra la clasificación ecotoxicológica basada en Unidades de Toxicidad.

$$UT = \frac{100}{EC_{50}(\%)} \quad [3.5]$$

Tabla 3.2. Clasificación por Unidades de Toxicidad (UT).

(Fuente: Manual de operación Microtox®).

$EC_{50}^*$	UT	Clasificación
<25%	>4	Muy tóxico
25-50%	(2 - 4)	Tóxico
51-75%	(1,33 - 1,99)	Moderadamente tóxico
76-99%	(1,32 - 1,01)	Ligeramente tóxico
>100%	<1,00	No tóxico

(\*)  $EC_{50}$  expresado en % (w/w) respecto a la disolución más concentrada del ensayo.

En relación con los errores cometidos en las determinaciones de los valores de  $EC_{50}$  mediante el método Microtox<sup>®</sup>, el intervalo de confianza del  $\log(EC_{50})$ , para un nivel de confianza del 95%, puede hallarse con la ecuación [3.6].

$$\log EC_{50} \pm t_{(0.025, N-2)} \cdot S \cdot \sqrt{\left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(\log \Gamma_{EC_{50}} - \overline{\log \Gamma})^2}{\sum_1^N (\log \Gamma - \log \Gamma_i)^2}\right]} \quad [3.6]$$

Donde:

- $EC_{50}$ : Concentración efectiva media (mg/L).  
 $t_{(0.025, N-2)}$ : Valor de la distribución t de Student para un nivel de confianza del 95% y N-2 grados de libertad.  
 $\Gamma_{EC_{50}}$ : Valor de  $\Gamma$  para la concentración efectiva media. (Es decir,  $\Gamma_{EC_{50}}=1$ . Por tanto,  $\log(\Gamma_{EC_{50}})=0$ ).  
 $\overline{\log \Gamma}$ : Media de todos los valores  $\log \Gamma_i$   
 $\Gamma_i$ :  $\Gamma$  para un ensayo i.  
 N: Número total de ensayos. (Todos los realizados para obtener la recta de regresión).  
 $S^2$ : Varianza residual, que es calculada con ayuda de la ecuación [3.7].

$$S^2 = \left[ \frac{1}{N-2} \right] \left[ \sum_1^N (\overline{\log C} - \log C_i)^2 - \frac{[\sum_1^N (\overline{\log \Gamma} - \log \Gamma_i) \cdot (\overline{\log C} - \log C_i)]^2}{\sum_1^N (\overline{\log \Gamma} - \log \Gamma_i)^2} \right] \quad [3.7]$$

Donde:

- $\overline{\log C}$ : Media de todos los valores de  $(\log C_i)$   
 $C_i$ : Concentración de muestra para un ensayo i (mg/L)

Finalmente, en relación con determinar el intervalo de confianza de los puntos de la curva Concentración-Efecto se ha realizado igualmente con ayuda de la distribución t de Student.

### 3.3. Estimación de ecotoxicidad mediante el software ECOSAR™

Otra forma de estimar la ecotoxicidad acuática cuando no se dispone de datos experimentales puede realizarse con ayuda del módulo ECOSAR™ (v1.11) del software EPI Suite™, desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos con el objetivo de predecir la ecotoxicidad en medios acuáticos en los casos en los que no se dispone de datos experimentales (US EPA, 2012). En efecto, es capaz de estimar propiedades físicas y químicas, junto con las medioambientales. Para conseguirlo, se vale de un modelo cuantitativo de relación entre estructura y actividad (QSAR).

ECOSAR™ se fundamenta en la semejanza en la estructura molecular del compuesto con otros cuyas propiedades ya se han obtenido experimentalmente. Así pues, los cálculos se apoyan en el coeficiente de partición octanol/agua,  $K_{ow}$ , y el peso molecular, MW. Estimando  $K_{ow}$  obtenemos ecuaciones de regresión que relacionan este coeficiente con la ecotoxicidad. Para facilitar su tarea, ECOSAR™ trabaja con 130 fragmentos o grupos funcionales, tales como aldehídos, amidas, anilinas, etc. Cada uno posee su propia dependencia entre  $K_{ow}$ /MW y ecotoxicidad.

A continuación, se van a describir brevemente los pasos tomados a la hora de estimar los parámetros ecotoxicológicos con este software.

En primer lugar, al abrir el programa EPI Suite™ nos encontramos la pantalla de la Figura 3.3, por medio de ésta accedemos al módulo ECOSAR™.

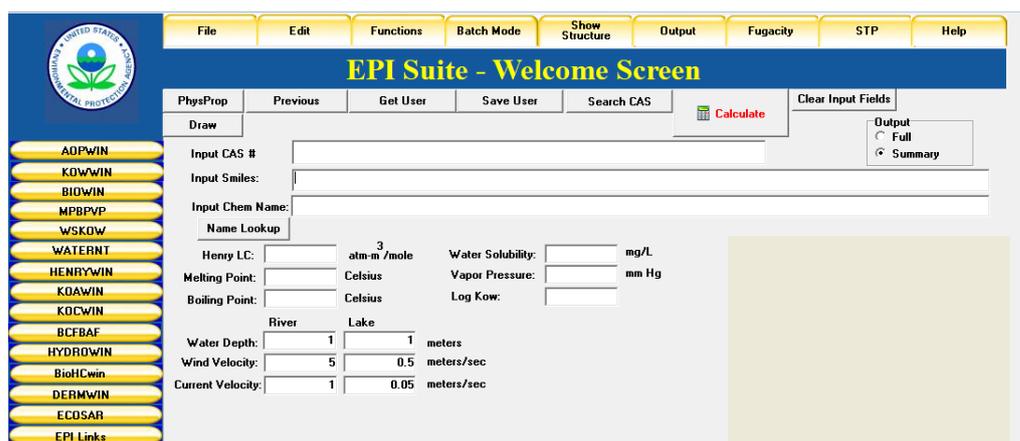


Figura 3.3. Pantalla de inicio de EPI Suite™.

Figura 3.4. Pantalla de inicio del módulo ECOSAR™.

Una vez dentro de ECOSAR™ (Figura 3.4), debemos introducir al menos un dato de la sustancia a estimar, que puede ser en forma SMILES, su nombre, su número CAS o su ID químico. Además, si disponemos de valores experimentales, como la solubilidad o la  $K_{ow}$ , los podemos añadir para una estimación más exacta, aunque en algunos casos el programa dispone de ellos en su base de datos.

Una vez se obtenga la hoja de resultados, el primer grupo de compuestos que distingue ECOSAR™ es el de aquellos cuyo mecanismo de acción se basa en la narcosis simple y los denomina Neutral Organic SAR. Una parte de los resultados se ofrecen partiendo de esta suposición.

El segundo grupo de compuestos que aparecen en de ECOSAR™ recibe el nombre de Compuestos Orgánicos con Exceso de Toxicidad. Poseen esta característica debido a que su mecanismo es distinto al anterior, se trata de un modo más específico de actuar, éstos se organizan en fragmentos o clases SAR, como, por ejemplo, fenoles o amidas. Igualmente, se muestran los resultados partiendo de esta hipótesis.

Existe un tercer grupo, que es el de sustancias surfactantes, pero no es de interés en nuestro caso particular, ya que ninguno de los compuestos con los que se ha trabajado pertenecen a ese grupo.

Finalmente, los resultados estimados por ECOSAR™ se clasificarán atendiendo al Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (Naciones Unidas, 2011).

### 3.4. Estimación de la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) en mezclas binarias

#### 3.4.1. Introducción a los modelos predictivos en mezclas.

Los organismos acuáticos no suelen estar expuestos a un solo tipo de compuesto, sino que coexisten con múltiples compuestos a la vez. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones no es factible medir la ecotoxicidad global, por lo que los ensayos se efectúan típicamente para una única sustancia. Una alternativa habitual es predecir la ecotoxicidad global a partir de las ecotoxicidades individuales de los componentes con ayuda de modelos matemáticos (Backhaus *et al.*, 2000).

Partiendo de las curvas Concentración-Efecto de las sustancias individuales, la concentración de un componente,  $c_j$ , en una mezcla puede formularse en función de la fracción másica  $w_j$  del compuesto en la mezcla de concentración  $c_{mix}$ , luego  $c_j = w_j * c_{mix}$ . Por consiguiente, la concentración total de la mezcla  $c_{mix}$  que implica un efecto del 50% sería la  $(EC_{50})_{mix}$ , la cual se estimará a continuación de acuerdo con varios tipos de modelos predictivos.

El primer modelo (CA, Concentration Addition) asume que todos los componentes de la mezcla poseen el mismo mecanismo de acción, que intervienen fisiológicamente en el mismo sitio y que no interaccionan entre sí. Este modelo está generalmente aceptado como una solución para el análisis de toxicidad en mezclas (Altenburguer *et al.*, 2000).

El segundo (IA, Independent Action) se fundamenta en lo opuesto al anterior, es decir, cada fármaco actúa en un lugar fisiológico que no ha sido afectado por el resto y que la forma de actuar de cada uno es diferente. Comparte con el modelo CA la suposición de que los componentes no interaccionan entre sí. (Faust *et al.*, 2003).

Estudios experimentales, con bacterias luminiscentes y algas en mezclas de sustancias de las que se conocía el mecanismo de acción, han demostrado que tanto el modelo CA como el IA son válidos si se cumplen sus respectivas hipótesis (Altenburguer *et al.*, 2004).

No obstante, los efectos ecotóxicos en las bacterias son mucho más complicados, es posible que existan modos de acción secundarios que no estén considerados por estos dos modelos. Asimismo, se ha demostrado que sí existen interacciones que influyen en la toxicidad global (Rider *et al.*, 2005).

Los dos modelos mencionados son los más comunes a la hora de predecir la ecotoxicidad, pero su mayor limitación reside en su suposición de que todos los modos de acción de los componentes son similares (CA) o que son diferentes (IA). Sin embargo, en la práctica nos encontramos que una mezcla está constituida por diversos compuestos que no tienen por qué poseer el mismo mecanismo de acción (Olmstead and LeBlanc, 2005).

Siguiendo esta línea, algunos autores construyen modelos que integran los dos tradicionales con el objetivo de evaluar la ecotoxicidad de una forma más precisa. Un ejemplo, que aplicaremos más adelante, es el desarrollado en Rider *et al.* (2005) y Olmstead and LeBlanc (2005), el modelo IAI (Integrated Addition and Interaction Model). En este modelo se combinan los conceptos de CA e IA: Las sustancias que presentan el mismo mecanismo de acción se asignan a un grupo y se calcula su ecotoxicidad global por medio del modelo CA. Por otro lado, la ecotoxicidad de los compuestos que presenten distintos mecanismos se estima mediante el modelo IA (Olmstead and LeBlanc, 2005).

Más recientemente, el modelo ICIM (Integrated Concentration Addition with Independent Action) (Qin *et al.*, 2011) aprovecha los valores de los modelos CA e IA, es decir, los integra por medio de una regresión lineal múltiple (MLR), un rasgo diferencial respecto a los modelos mencionados hasta el momento. Asimismo, para evaluar los resultados, se realiza una validación cruzada, una técnica muy común en el desarrollo de modelos de inteligencia artificial.

Por último, sabemos que es posible predecir las propiedades de una fase líquida mediante correlaciones de coeficientes de actividad, con la condición de que dispongamos de datos experimentales para hallar los llamados parámetros de interacción binaria, los cuales están presentes en estas correlaciones (Henley and Seader, 1990). De este modo, estableciendo una analogía con los equilibrios líquido-vapor, se propone un nuevo modelo predictivo basado en una ecuación tipo van Laar, que corrige una ecuación lineal similar a la ley de Raoult, pero en este caso con “coeficientes de actividad ecotoxicológica”.

#### 3.4.2. Modelo CA (Concentration Addition).

La concentración efectiva media de una mezcla binaria, de acuerdo con el modelo CA,  $(EC_{50})_{mix,CA}$ , se obtiene a partir de los valores experimentales de las concentraciones efectivas medias individuales de sus componentes,  $(EC_{50})_{j,exp}$ , y de las fracciones másicas de cada fármaco en la mezcla,  $w_j$ , de acuerdo con la expresión [3.8].

$$(EC_{50})_{mix,CA} = \left( \sum_{j=1}^2 \frac{w_j}{(EC_{50})_{j,exp}} \right)^{-1} \quad [3.8]$$

Donde:

- $w_j$ : Fracción másica del compuesto j (adimensional).
- $(EC_{50})_{mix,CA}$ : Concentración efectiva media de la mezcla binaria predicha por el modelo CA (mg/L).
- $(EC_{50})_{j,exp}$ : Concentración efectiva media individual del compuesto j, medida experimentalmente (mg/L).

### 3.4.3. Modelo IA (Independent Action).

Según el modelo IA, el efecto ecotoxicológico total de una mezcla binaria, en tanto por uno, con una concentración  $c_{mix}$  posee la siguiente forma:

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{j=1}^2 (1 - E_j(c_j)) \quad [3.9]$$

Como ya se ha mencionado, los efectos individuales  $E_j(c_j)$  pueden enunciarse en función de las fracciones másicas de estos compuestos en la mezcla  $E_j(w_j \cdot c_{mix})$ . Si imponemos la condición de que el efecto global de la mezcla sea el 50%, esto implica que la concentración total de fármacos en la mezcla a la que sucede esto, para este modelo, será  $c_{mix} = (EC_{50})_{mix,IA}$ .

De ahí se deduce finalmente:

$$0,5 = 1 - \prod_{j=1}^2 (1 - E_j(w_j \cdot (EC_{50})_{mix,IA})) \quad [3.10]$$

No es posible obtener  $(EC_{50})_{mix,IA}$  de forma explícita, por tanto, se aproximará por métodos iterativos (Faust *et al.*, 2003).

Por otro lado, la función Concentración-Efecto experimental de cada componente  $E_j(c_j)$  se ajusta habitualmente a una distribución de Weibull,  $F_j(c_j)$ , ecuación [3.11] (Villa *et al.*, 2014).

$$F_j(c_j) = E_j(c_j) = 1 - \exp\left(-\exp\left(\alpha + \beta \cdot \log(c_j)\right)\right) \quad [3.11]$$

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son parámetros del modelo,  $c_j$  es la concentración de una especie individualmente y  $E_j$  es el efecto inhibitorio causado por ésta, en tanto por uno.

Nota: de ahora en adelante reservamos el subíndice  $j=1$  para el fármaco con mayor  $EC_{50}$  (menos ecotóxico), en este caso el Paracetamol.

#### 3.4.4. Modelo IAI (Integrated Addition and Interaction)

Como se ha mencionado, en los dos estudios de Olmstead and LeBlanc (2005) y Rider *et al.* (2005) se desarrolla un modelo que combina los conceptos de los dos modelos predecesores, CA e IA, dando como resultado el modelo IAI (Integrated Addition and Interaction).

En primer lugar, de manera análoga a como se ha procedido en el modelo IA, ajustamos las curvas Concentración-Efecto de cada componente  $j$ . La ecuación de ajuste en este caso tendrá la forma de la expresión [3.12]

$$E_j(c_j) = \frac{1}{1 + \left(\frac{(EC_{50})_{j,exp}}{c_j}\right)^{\rho_j}} \quad [3.12]$$

Donde  $\rho_j$  es la pendiente de la curva sigmoideal Concentración-Efecto del compuesto  $j$ . Para hallar el valor de la pendiente, linealizamos la función [3.12] tomando logaritmos decimales. La función lineal resultante viene dada por la ecuación [3.13].

$$\log\left(\frac{1}{1 - E_j(c_j)}\right) = -\rho_j \cdot \log((EC_{50})_{j,exp}) + \rho_j \cdot \log(c_j) \quad [3.13]$$

Como resultado de integrar las expresiones [3.8] y [3.9], obtenemos la ecuación del modelo IAI [3.14] (Olmstead and LeBlanc, 2005).

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{j=1}^2 \left[ 1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\left(\sum_{j=1}^2 \frac{c_j}{(EC_{50})_{j,exp}}\right)^{\rho'}}} \right] \quad [3.14]$$

Donde  $\rho'$  es la media de las pendientes de los compuestos del grupo asociado al modelo CA, pero como únicamente tenemos dos componentes en la mezcla, ésta representa la pendiente individual de un compuesto,  $\rho_j$ . En otras palabras, al ser una mezcla binaria disponemos de una sustancia por grupo.

Asimismo, sabemos que  $c_j = w_j \cdot c_{mix}$  y que  $c_{mix} = (EC_{50})_{mix,IAI}$  cuando  $E(c_{mix}) = 0,5$ . Con lo cual, la expresión [3.14] se transforma en la [3.15]

$$0,5 = 1 - \left( 1 - \frac{1}{1 + \left( \frac{(EC_{50})_{1,exp}}{w_1 (EC_{50})_{mix,IAI}} \right)^{\rho_1}} \right) \left( 1 - \frac{1}{1 + \left( \frac{(EC_{50})_{2,exp}}{w_2 (EC_{50})_{mix,IAI}} \right)^{\rho_2}} \right) \quad [3.15]$$

Finalmente, se obtiene  $(EC_{50})_{mix,IAI}$  por métodos iterativos para una mezcla binaria de fracción másica  $w_j$ ,

### 3.4.5. Modelo van Laar a partir de coeficientes de “actividad ecotoxicológica”

Haciendo una analogía con la ley de Raoult, que rige el equilibrio líquido-vapor en soluciones ideales, planteamos la ecuación [3.16] con la que sería posible predecir la ecotoxicidad de una mezcla binaria ideal (representado aquí como  $(EC_{50})_{mix}^*$ ) con una fracción másica  $w_j$  del componente  $j$ :

$$(EC_{50})_{mix}^* = \sum_{j=1}^2 (EC_{50})_{j,exp} \cdot w_j \quad [3.16]$$

Sin embargo, se sabe que la ecotoxicidad de una mezcla binaria no sigue un comportamiento ideal. En consecuencia, si queremos predecir el comportamiento real, es inevitable realizar una corrección de esta desviación. Análogamente a como se hace en la ley de Raoult, en este trabajo se van a proponer unos coeficientes de “actividad ecotoxicológica”,  $\gamma_j'$  que transformen la expresión [3.16] en la [3.17] para determinar la concentración efectiva media real siguiendo un modelo tipo van Laar,  $(EC_{50})_{mix,VL}$ .

$$(EC_{50})_{mix,VL} = \sum_{j=1}^2 (EC_{50})_{j,exp} \cdot \gamma_j' \cdot w_j \quad [3.17]$$

Entre las correlaciones candidatas a ajustarse a nuestros datos experimentales de ecotoxicidad se encuentra la de van Laar, en la que para una mezcla binaria los coeficientes de actividad de los dos compuestos vendrían dados por las ecuaciones [3.18] y [3.19].

$$\ln(\gamma_1') = A_{12} \left[ \frac{A_{21} w_2}{A_{12} w_1 + A_{21} w_2} \right]^2 \quad [3.18]$$

$$\ln(\gamma'_2) = A_{21} \left[ \frac{A_{12} w_1}{A_{12} w_1 + A_{21} w_2} \right]^2 \quad [3.19]$$

Donde:

- $A_{12}$  y  $A_{21}$ : Parámetros de interacción binaria, a determinar. En la práctica los hallaremos realizando un ajuste por mínimos cuadrados con tres datos experimentales de ecotoxicidad. Es decir, se minimiza la suma de errores cuadráticos entre [3.16] y [3.17]. Consultar Anexo A.5.
- $\gamma'_1$ : Coeficiente de actividad “ecotoxicológica” en la ecuación tipo van Laar del compuesto 1.
- $\gamma'_2$ : Coeficiente de actividad “ecotoxicológica” en la ecuación tipo van Laar del compuesto 2.
- $w_1$  y  $w_2$ : Fracciones másicas del componente 1 y 2, respectivamente.

Entre los motivos por los que hemos elegido la ecuación de van Laar están su flexibilidad y su amplio rango de validez para un gran número de sistemas. Asimismo, su uso está muy extendido en el terreno práctico (Henley and Seader, 1990).

#### 3.4.6. Modelo ICIM (Integrated Concentration Addition with Independent Action)

El modelo ICIM fue propuesto por Qin *et al.* (2011) a raíz de la falta de criterios a la hora de elegir entre un modelo tradicional u otro, ya que la mayoría de las ocasiones no se conoce el modo de acción de los componentes.

Se trata de una alternativa basada en una regresión lineal múltiple donde la concentración efectiva media  $(EC_{50})_{mix,ICIM}$  de cada mezcla es la variable dependiente y las respectivas concentraciones efectivas medias obtenidas de los modelos CA e IA son las dos variables independientes. Matemáticamente, el resultado de esta afirmación se expresa, tomando logaritmos decimales, en la ecuación [3.20]

$$\log((EC_{50})_{mix,ICIM}) = b_0 + b_1 \log((EC_{50})_{mix,CA}) + b_2 \log((EC_{50})_{mix,IA}) \quad [3.20]$$

Donde  $b_0$ ,  $b_1$  y  $b_2$  son los coeficientes de regresión.

Puesto que ya disponemos de los valores de concentración efectiva media para los modelos CA e IA, el siguiente paso es ajustar el nuevo modelo a N datos experimentales, para ello realizamos un ajuste por mínimos cuadrados, análogo al efectuado para la ecuación tipo van Laar.

Para el modelo ICIM la Función Objetivo (FO) viene dada por la expresión [3.21].

$$FO = \text{MÍN} \left[ \sum_{i=1}^N \left( \log \left( (EC_{50})_{mix,exp} \right) - \log \left( (EC_{50})_{mix,ICIM} \right) \right)_i^2 \right] \quad [3.21]$$

En resumen, se minimiza la ecuación [3.21] variando los tres coeficientes de regresión.

La segunda parte del procedimiento consiste en realizar una validación interna por medio del método de validación cruzada dejando uno fuera (leave-one-out cross-validation, LOOCV). La validación cruzada se fundamenta en juzgar si el modelo garantiza la predicción de puntos que no se han empleado para realizar el ajuste y se efectúa dividiendo la muestra en subconjuntos (James *et al.* 2013).

LOOCV se fundamenta en dividir una muestra de N observaciones en dos partes en cada iteración: una parte de entrenamiento (N-1 observaciones) y otra de validación (1 observación). El objetivo es que el modelo “aprenda” en la parte de entrenamiento y que se evalúe el error cometido con la muestra restante.

A continuación, aplicamos para los N-1 observaciones de entrenamiento la ecuación [3.21], calculamos los coeficientes de regresión  $b_0$ ,  $b_1$  y  $b_2$  para esas N-1 observaciones, y por medio de la expresión [3.20] predecimos la concentración efectiva media para el punto restante, es decir, determinamos el error cometido. Así, se ejecutan N iteraciones para los N puntos de la muestra Ver Figura 3.5.

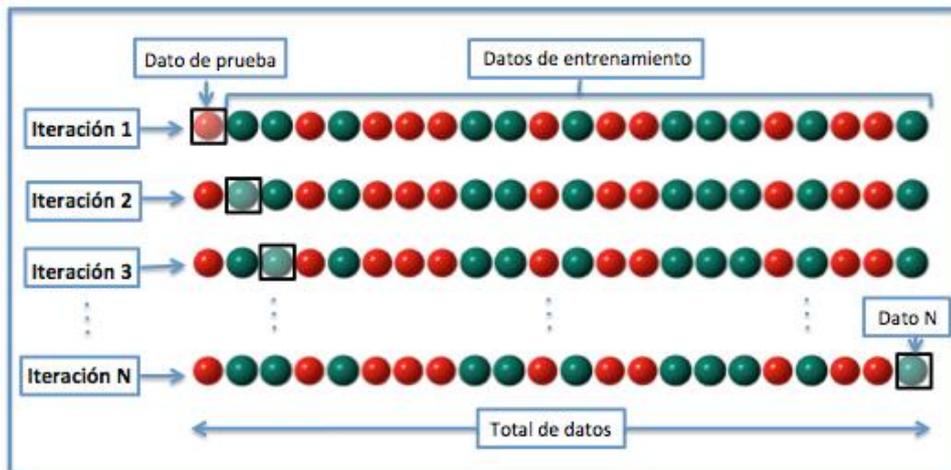


Figura 3.5. Esquema del método LOOCV.  
(Fuente: <https://commons.wikimedia.org/>)

Con relación al error de una iteración  $i$ , éste se calcula por medio del error cuadrático medio ( $MSE_i$ ), siendo el error global de la validación, CV, el promedio de los errores cometidos (Ecuación [3.22]).

$$CV = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N MSE_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N ((EC_{50})_{mix,exp} - (EC_{50})'_{mix,ICIM})_i^2 \quad [3.22]$$

Donde  $(EC_{50})'_{mix,ICIM}$  es la concentración efectiva media teniendo en cuenta todas las observaciones excepto una, hallada a través de la expresión [3.20].

Por otro lado, además de realizar el ajuste de las  $N=7$  observaciones y su posterior validación cruzada, se ha efectuado otro modelado, pero en esta ocasión teniendo en cuenta solo 3 observaciones, a partir de las cuales se busca encontrar un modelo de predicción para cualquier mezcla binaria no experimentada; es decir, se aplicaría el modelo ICIM como un modelo de predicción que requiere una mínima experimentación. A este último modelo lo denotamos como ICIM(3) y consiste en realizar un ajuste a fracciones másicas de Paracetamol de  $w_1=0,05$ ;  $w_1=0,53$ ; y  $w_1=0,95$ . La razón por la que tomamos estas 3 fracciones másicas es que abarcan todo el rango de  $w_j(0,1)$ .

Finalmente, se ha validado estimando la concentración efectiva media del resto de las observaciones ( $w_1=0,20$ ;  $w_1=0,375$ ;  $w_1=0,77$  y  $w_1=0,85$ ). Es decir, se compara la concentración efectiva media experimental de estas 4 últimas fracciones másicas con la estimada mediante el ajuste a las fracciones másicas de  $w_1=0,05$ ;  $w_1=0,53$ ; y  $w_1=0,95$ .

Los procedimientos asociados a los modelos ICIM e ICIM(3) se presentan en la Figura 3.6. Es preciso destacar que los pasos a y b se han realizado previamente en el apartado dedicado a los modelos CA e IA.

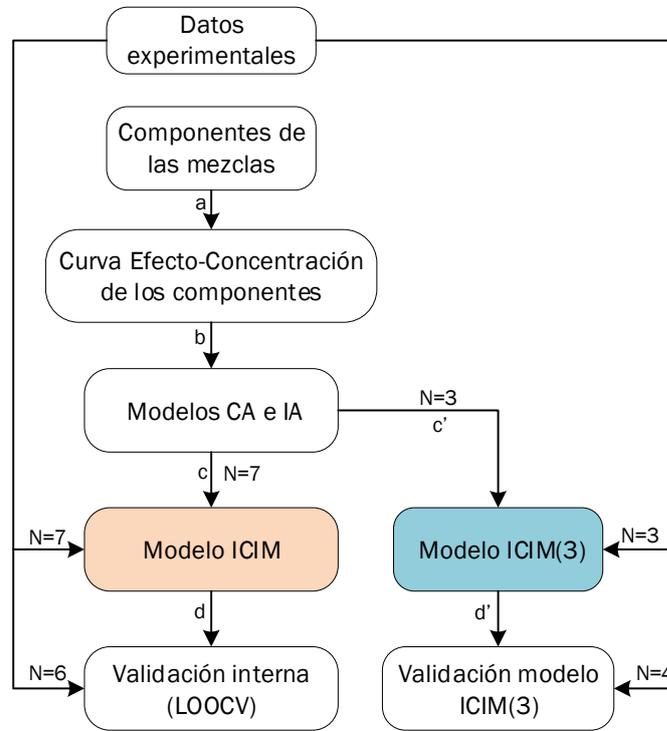


Figura 3.6. Esquema de los modelos ICIM e ICIM(3).

## 4. Resultados y discusión.

### 4.1. Ecotoxicidad individual de Edaravone y Paracetamol.

#### 4.1.1. Determinaciones mediante Microtox®.

En la Figura 4.1 se muestran los resultados ecotoxicológicos obtenidos para el fármaco Edaravone partiendo de soluciones madre de 400 y 600 mg/L, siempre atendiendo a la solubilidad del compuesto, y para tiempos de exposición de 5 y 15 minutos.

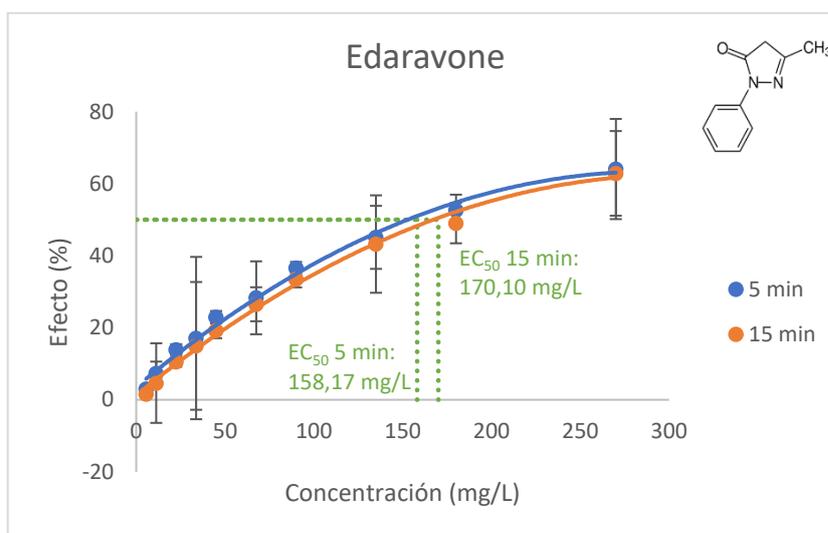


Figura 4.1. Curva Concentración-Efecto del fármaco Edaravone.

Como se observa en la Figura 4.1, las dos curvas varían levemente para los dos tiempos de ensayo, esto significa que la emisión de luz continúa decreciendo después de 5 minutos. Este fenómeno ocurre para todos los experimentos con Edaravone, es consecuencia de que cada compuesto químico afecta de diferente forma a los microorganismos, ya que los mecanismos de acción en éstos difieren también.

En algunos casos, el efecto sobre la luminosidad es suficiente para  $t=5$  min, en otros es necesario disponer de los resultados a los 15 minutos, para una mayor fiabilidad. Se han realizado todos los ensayos para estos dos tiempos, tal y como se recomienda en el manual del equipo.

En la Figura 4.2 se presentan los resultados obtenidos de  $\Gamma$  para diferentes concentraciones del fármaco Edaravone, una vez linealizados éstos mediante la transformación logarítmica propuesta en la ecuación [3.3].

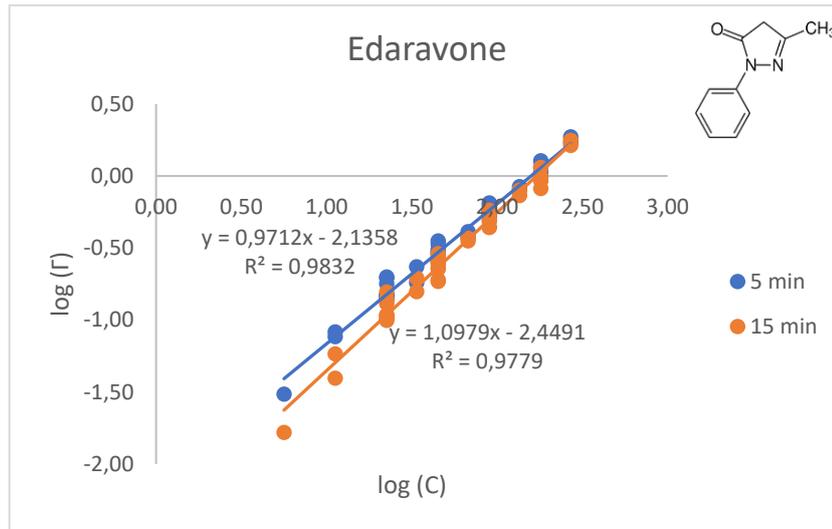


Figura 4.2. Curva log  $\Gamma$  vs log (Concentración).

A partir de la Figura 4.2. realizamos una interpolación lineal para  $\log(\Gamma)=0$  (es decir,  $\Gamma=1$ , que se corresponde a la concentración  $C=EC_{50}$ ), tal como explicamos en el apartado de cálculos, obteniendo los siguientes resultados:

$$EC_{50}(5 \text{ min}) = 158,17 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$EC_{50}(15 \text{ min}) = 170,10 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Dando como resultado los siguientes intervalos de confianza, para un nivel de confianza del 95%:

- 5 minutos:  $EC_{50} \in [117,23 - 213,42] \text{ mg/L}$ .
- 15 minutos:  $EC_{50} \in [125,82 - 229,97] \text{ mg/L}$ .

Calculados con ayuda de las ecuaciones [3.6] y [3.7].

Con respecto a las Unidades de Toxicidad (UT), se hallan por medio de la ecuación [3.5]

$$UT(5 \text{ min}) = \frac{100}{EC_{50}(\%)} = \frac{100}{\left(\frac{158,17 \text{ mg/L}}{270 \text{ mg/L}}\right) * 100} = 1,71$$

$$UT(15 \text{ min}) = \frac{100}{EC_{50}(\%)} = \frac{100}{\left(\frac{170,10 \text{ mg/L}}{270 \text{ mg/L}}\right) * 100} = 1,59$$

Según el criterio de clasificación propuesto en la Tabla 3.2, Edaravone estaría incluido en el grupo de compuestos “moderadamente tóxicos”.

En relación con el Paracetamol, en las Figuras 4.3. y 4.4. se grafican los resultados para soluciones madre de concentración 2000 mg/L, siempre atendiendo a la solubilidad del compuesto.

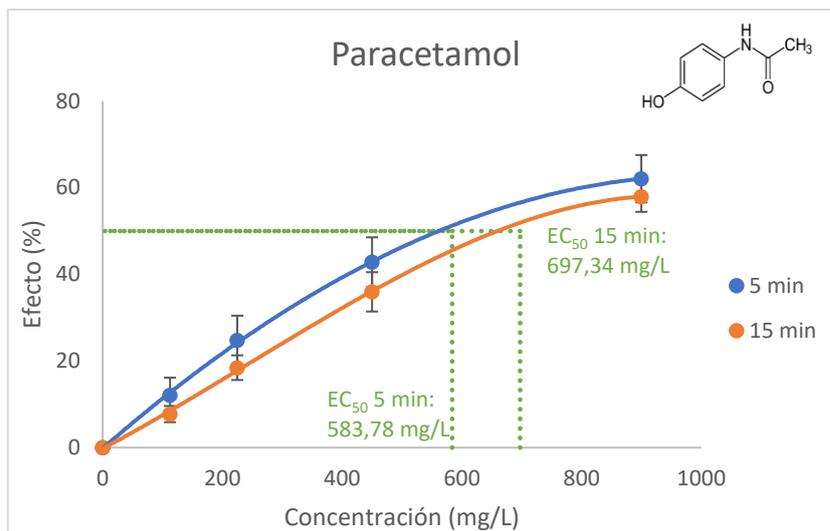


Figura 4.3. Curva Concentración-Efecto del fármaco Paracetamol.

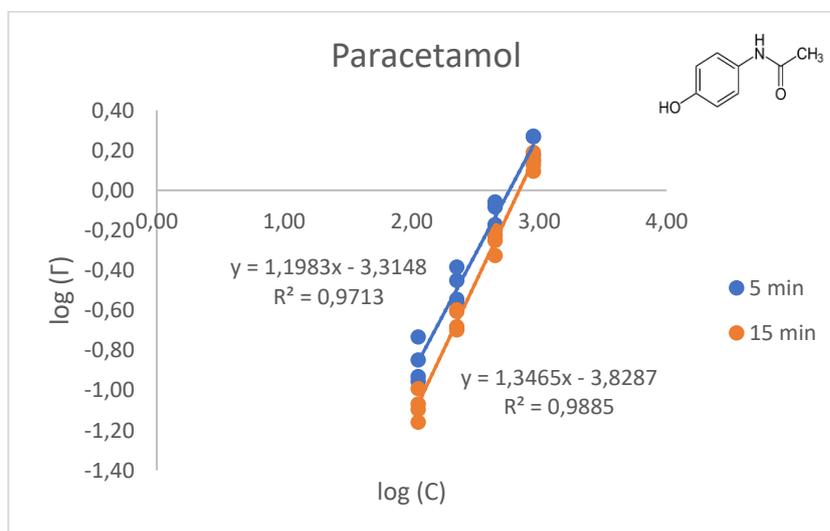


Figura 4.4. Curva log  $\Gamma$  vs log (Concentración).

Análogamente al Edaravone, las concentraciones efectivas medias resultantes serían:

$$EC_{50}(5 \text{ min}) = 583,78 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$EC_{50}(15 \text{ min}) = 697,34 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Dando como resultado los siguientes intervalos, para un nivel de confianza de 95%:

- 5 minutos:  $EC_{50} \in [392,23 - 868,88]$  mg/L.
- 15 minutos:  $EC_{50} \in [466,54 - 1042,33]$  mg/L.

Igualmente, calculados con ayuda de las ecuaciones [3.6] y [3.7].

Por otro lado, como se ha realizado para Edaravone, aplicamos la ecuación 3.5 con el fin de determinar las Unidades de Toxicidad (UT).

$$UT(5 \text{ min}) = \frac{100}{EC_{50}(\%)} = \frac{100}{\left(\frac{583,78 \text{ mg/L}}{900 \text{ mg/L}}\right) * 100} = 1,54$$

$$UT(15 \text{ min}) = \frac{100}{EC_{50}(\%)} = \frac{100}{\left(\frac{697,34 \text{ mg/L}}{900 \text{ mg/L}}\right) * 100} = 1,29$$

De acuerdo con el criterio de clasificación propuesto en la Tabla 3.2, el Paracetamol pertenecería al grupo de compuestos “moderadamente tóxicos” para t=5 minutos y de “ligeramente tóxicos” para t=15 minutos.

Tanto en la curva log  $\Gamma$  vs log (C) del Edaravone como en la del Paracetamol se observa un aumento de la dispersión de los resultados a medida que se reduce la concentración, esto se debe a los errores relativos de pipeteo, que se hacen más notables en las disoluciones más diluidas.

No se tiene constancia de que existan estudios ecotoxicológicos previos del fármaco Edaravone para la bacteria *Vibrio fisheri*, por tanto, no es posible realizar una comparación con otros resultados. De acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS), Edaravone se incluiría en la categoría de “No tóxicos” ( $EC_{50} > 100$  mg/L).

Con relación a estudios ecotoxicológicos previos del Paracetamol, Ortiz *et al.* (2014) obtienen resultados muy similares a los nuestros. Asimismo, también clasifican al fármaco como “No tóxico”, al poseer una  $EC_{50} > 100$  mg/L, atendiendo al criterio de clasificación GHS.

Finalmente, cabe destacar que estos valores de ecotoxicidad individual son imprescindibles para calcular posteriormente las  $EC_{50}$  esperadas en mezclas binarias de estos dos fármacos.

#### 4.1.2. Estimación mediante ECOSAR™

A continuación, se presentan los resultados de ecotoxicidad predichos por el software ECOSAR™ para los fármacos Edaravone y Paracetamol. Es necesario destacar que ECOSAR™ no permite estimar ecotoxicidades de mezclas, sino únicamente de especies puras.

Tabla 4.1. Resultados de ecotoxicidad para Edaravone y Paracetamol predichos por ECOSAR™.

Compuesto	Parámetro de ecotoxicidad (mg/L)					
	Aguda			Crónica		
	LC <sub>50</sub> Fish (96 h)	LC <sub>50</sub> Daphnid (48 h)	EC <sub>50</sub> Green Algae (96 h)	ChV Fish	ChV Daphnid	ChV Green Algae
Edaravone	44,754	26,766	24,710	4,651	3,016	7,264
Paracetamol	3000,054	1477,661	611,425	247,963	97,009	116,66

Los valores de la Tabla 4.1. se han extraído de la hoja de resultados de Edaravone y Paracetamol, Tablas A.2.1 y A.2.2 del Anexo A.2

Como se aprecia en la Tabla 4.1. los valores de ecotoxicidad entre los dos compuestos difieren enormemente para todos los organismos de estudio. Esta variación es mucho más marcada que en el caso experimental con las bacterias *Vibrio fischeri*

Además, se consigue una mayor semejanza ecotoxicológica con las algas verdes. En el estudio de Irusta *et al.* (2011) se evalúa la ecotoxicidad de 27 compuestos activos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs) a nivel experimental y predictivo, la mayor correlación que obtiene es al comparar valores experimentales (*Vibrio fischeri*) con QSAR (algas verdes), por lo que concuerda con nuestro resultado.

Asimismo, para ambos compuestos se manifiesta un aumento de la sensibilidad del organismo a medida que éste desciende en complejidad (Peces>Daphnia>Algas verdes), resultando las algas verdes las más sensibles a los fármacos, al igual que en la publicación de Irusta *et al.* (2011) para el Paracetamol. En el caso del fármaco Edaravone no se dispone de trabajos previos que nos permitan contrastar los resultados.

Si clasificamos a ambos compuestos según el criterio establecido por el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS) (Naciones Unidas, 2011), se concluye que Paracetamol se incluiría en el grupo de “No tóxicos”, que coincide con el determinado experimentalmente. Edaravone pertenecería a la categoría de “Dañino para organismos acuáticos”, que no concuerda con el calculado en el ensayo de bioluminiscencia. En Irusta *et al.* (2011) se menciona que esta discrepancia en las categorías entre los datos experimentales y predictivos puede deberse a que no se han contemplado otros factores, como la concentración de estas sustancias en el medio acuático.

A la vista de los resultados de las Tablas del Anexo A.2 y los datos experimentales sobre *Vibrio fischeri* (organismo más semejante), se ha supuesto que los fármacos actúan por medio de la narcosis simple no polar (Neutral Organic SAR), este mecanismo está referido a la línea base de toxicidad o a la toxicidad mínima. Se entiende como narcosis simple no polar a la pérdida reversible de la conciencia inducida por un compuesto químico (Mayo *et al.*, 2017), en cambio los compuestos narcóticos polares presentan una toxicidad por encima de la mínima y están caracterizados por tener enlaces de hidrógeno (Verhaar *et al.*, 1992).

Es necesario destacar que, en el caso del Paracetamol, la narcosis simple viene respaldada por estudios QSAR de Ortiz *et al.*, 2014, pero para Edaravone no disponemos de trabajos previos, por lo que se planteará la hipótesis de que su medio de acción es también la narcosis simple.

Asimismo, comprobaremos si los supuestos han sido correctos, apoyándonos en dos ecuaciones QSAR desarrolladas por Vighi *et al.* (2009), que estiman la respuesta de dos modos de acción en la bacteria *Vibrio fischeri*: narcosis simple (ecuación [4.1]) y narcosis polar (ecuación [4.2]), para  $t=15$  minutos. En ambas expresiones, la concentración efectiva media viene dada en  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

$$\log\left(\frac{1}{EC_{50,narc}}\right) = 0,94 \cdot \log(K_{ow}) - 2,61 \quad [4.1]$$
$$R^2 = 0,92$$

$$\log\left(\frac{1}{EC_{50,polar}}\right) = 0,502 \cdot \log(K_{ow}) - 0,294 \quad [4.2]$$
$$R^2 = 0,82$$

Donde:

$EC_{50,narc}$ : Concentración efectiva media en *Vibrio fischeri* si el mecanismo de acción fuera la narcosis simple [=] mmol·L<sup>-1</sup>

$EC_{50,polar}$ : Concentración efectiva media en *Vibrio fischeri* si el mecanismo de acción fuera la narcosis polar. [=] mmol·L<sup>-1</sup>

Cabe destacar que las dos ecuaciones dependen de lo fiable que sea el valor del coeficiente de partición octanol/agua,  $K_{ow}$ . En el caso del Edaravone no existen datos experimentales, por lo que lo estimamos por medio del software ECOSAR™.

Con relación a comparar cuánto se aleja cada fármaco de la línea base, que sería el efecto tóxico mínimo o efecto narcótico, se calcula el llamado ratio de toxicidad, TR (Vighi *et al.*, 2009) que para la narcosis simple viene dado por la ecuación [4.3].

$$TR = \frac{EC_{50,narc}}{EC_{50,exp}} \quad [4.3]$$

Donde:

$EC_{50,exp}$ : Concentración efectiva media experimental en *Vibrio fischeri*, que pasamos de mg·L<sup>-1</sup> a mmol·L<sup>-1</sup>. (MW<sub>1</sub>=151,17 mg·mmol<sup>-1</sup>; MW<sub>2</sub>=174,20 mg·mmol<sup>-1</sup>)

Aplicando las ecuaciones [4.1] y [4.2] y estimando un log ( $K_{ow}$ )=2,562 para el Edaravone (ECOSAR™) y un log ( $K_{ow}$ )=0,460 para el Paracetamol, éste último nos lo proporciona el software de forma experimental, se obtienen los resultados que se presentan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Ratios de toxicidad de los fármacos Edaravone y Paracetamol.

	EC <sub>50 exp</sub> (mg/L)	EC <sub>50, narc</sub> (mg/l)	$TR = \frac{EC_{50,narc}}{EC_{50,exp}}$	EC <sub>50 polar</sub> (mg/L)	$TR = \frac{EC_{50,polar}}{EC_{50,exp}}$
Paracetamol (1)	697,34	22 754,41	32,63	45,14	0,06
Edaravone (2)	170,10	277,18	1,63	4,58	0,03

A la vista de los resultados de la Tabla 4.2, deducimos que el Edaravone puede clasificarse como un compuesto cuyo principal medio de acción es la narcosis simple ( $TR=1,63$ ; según este cociente, la  $EC_{50}$  estimada según la narcosis simple es la más parecida a la que resulta de la medición experimental.

Con relación al Paracetamol, parece ser que ninguno de los dos mecanismos se acerca a la ecotoxicidad experimental, por lo que no es posible incluirlo en ninguno de los dos grupos. De acuerdo con *Vighi et al.* (2009), existen compuestos químicos que no se corresponden con narcóticos simples ni con narcóticos polares, se trataría de unas sustancias con un modo de actuar muy específico, que estaría relacionado con la fisiología de la bacteria *Vibrio fischeri*.

Por otro lado, observamos que el grupo hidrazina, que solo está presente en el fármaco Edaravone (Tabla A.2.1 del Anexo A.2) posee un mayor efecto, ya que los valores ecotoxicológicos son aproximadamente de un orden de magnitud más pequeños, comparados con el otro grupo funcional amida que nos presenta el software, el cual también forma parte de la molécula de Paracetamol (Tabla A.2.2 del Anexo A.2). Esa podría ser una de las razones que explicarían la diferencia de ecotoxicidad entre la molécula de Edaravone y la de Paracetamol.

## 4.2. Ecotoxicidad de mezclas binarias Paracetamol/Edaravone

### 4.2.1. Determinación experimental mediante Microtox®

A continuación, se muestran las gráficas experimentales Concentración-Efecto, obtenidas mediante ensayos de bioluminiscencia con Microtox® para soluciones acuosas de mezclas binarias de Edaravone y Paracetamol. Las gráficas de la Figura 4.5 representa los resultados ecotoxicológicos obtenidos para mezclas binarias Paracetamol/Edaravone con diferentes proporciones de cada uno de los dos fármacos (Fracciones másicas de Paracetamol:  $w_1=0,05$ ;  $w_1=0,20$ ;  $w_1=0,375$ ;  $w_1=0,53$ ;  $w_1=0,77$ ;  $w_1=0,85$  y  $w_1=0,95$ ).

En algunos casos no se incluye intervalo de confianza, esto es debido a que para esas concentraciones los ensayos se realizaron únicamente por duplicado.

En la Figura 4.5 se representan las curvas Concentración-Efecto de diferentes mezclas binarias Paracetamol/Edaravone, a partir de las cuales se han obtenido las correspondientes concentraciones efectivas medias experimentales de las mezclas,  $(EC_{50})_{mix,exp}$ , tal y como se hizo para estos compuestos individualmente.

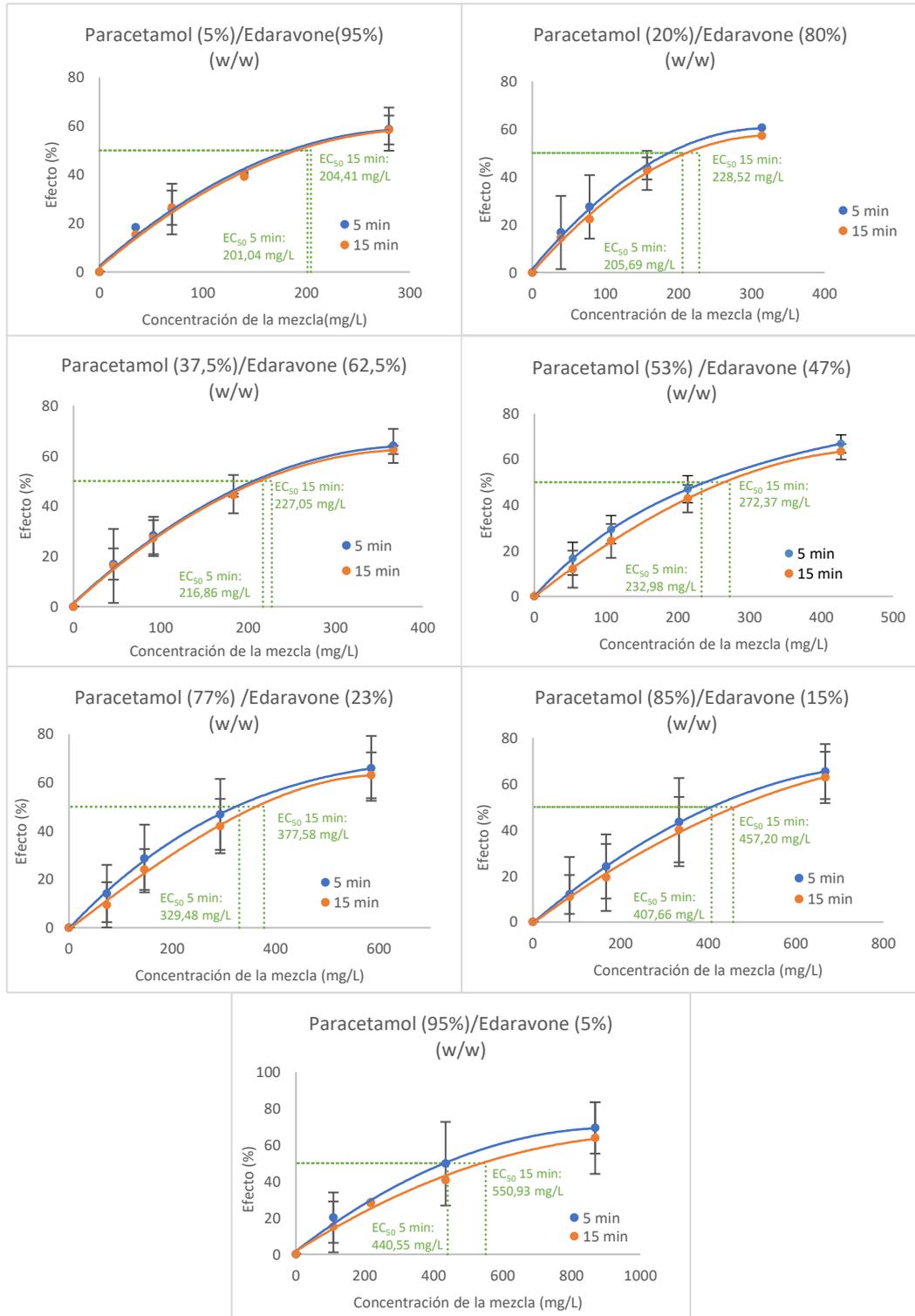


Figura 4.5. Curvas Concentración-Efecto de las mezclas binarias Paracetamol/Edaravone.

En las Figuras 4.6 y 4.7 se han representado los valores de  $(EC_{50})_{mix,exp}$ , así como los valores esperados teóricamente si las mezclas exhibieran un comportamiento ideal,  $(EC_{50})_{mix,ideal}^*$ , para diferentes tiempos de exposición y proporciones relativas Paracetamol/Edaravone en la mezcla.

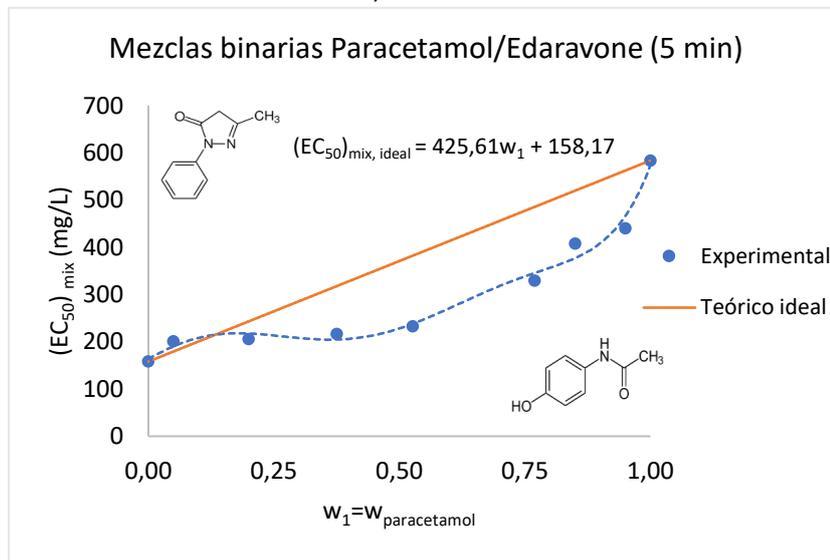


Figura 4.6.  $EC_{50}$  de mezclas binarias Paracetamol/Edaravone (5 min).

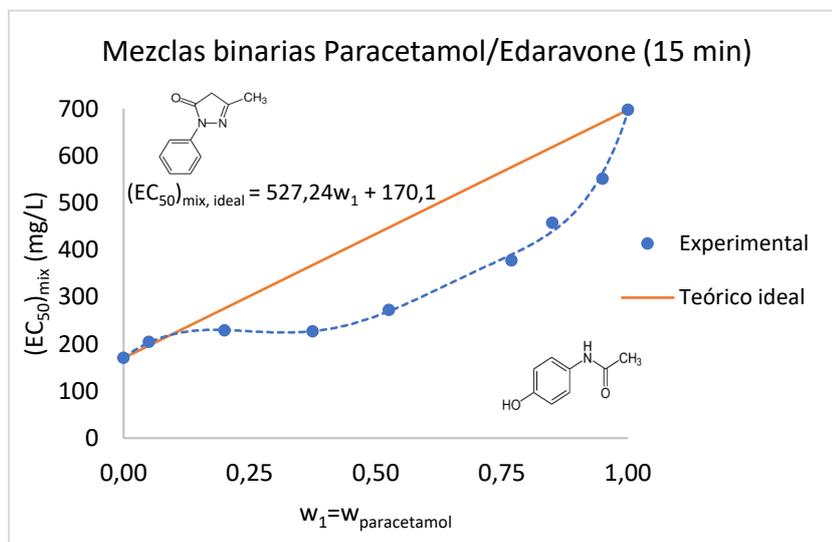


Figura 4.7.  $EC_{50}$  de mezclas binarias Paracetamol/Edaravone (15 min).

Como se observa en las Figuras 4.6 y 4.7 y en la Tabla 4.5, los valores de  $(EC_{50})_{mix,exp}$  en disoluciones con fracciones másicas de Paracetamol mayores de 0,2 son menores que los valores teóricos ideales  $(EC_{50})_{mix,ideal}^*$ . Esto significa que la mezcla de los dos fármacos es más ecotóxica en este rango de

concentraciones que la que cabría esperar debido al efecto aditivo de ecotoxicidades individuales; en otras palabras, la mezcla induce un efecto sinérgico. Se define el sinergismo como un aumento del efecto inhibitorio respecto al efecto aditivo (teórico ideal); el antagonismo sería el inverso del sinergismo, es decir, un aumento del efecto estimuladorio.

Sin embargo, para disoluciones concentradas en Edaravone ( $w_1 < 0,2$ ) sucede lo contrario, la presencia de pequeñas cantidades de Paracetamol en Edaravone disminuye la ecotoxicidad de la mezcla con respecto a la que teóricamente cabría esperar, es decir, tiene un efecto antagónico. Es destacable que esta clase de efecto disminuya al aumentar el tiempo de exposición (ver Figuras 4.6 y 4.7), al igual que en los trabajos de Ortiz *et al.* (2016).

Por otro lado, Ortiz *et al.* (2016), en su estudio de ecotoxicidad en mezclas de PhAC's, sugieren que un comportamiento diferente respecto al ideal podría ser causado por la formación o transformación de las sustancias debido a interacciones naturales, cambios a nivel fisicoquímico o en las condiciones ambientales.

Tabla 4.5.  $EC_{50}$  experimentales y teóricas ideales en mezclas binarias Paracetamol/Edaravone.

$w_1$ (w/w)	$w_2$ (w/w)	Experimental ( $EC_{50}$ ) <sub>mix,exp</sub> (mg/L)		Teórico ideal ( $EC_{50}$ ) <sub>mix*</sub> (mg/L)	
		5 min	15 min	5 min	15 min
0	1	158,17	170,10	158,17	170,10
0,05	0,95	201,04	204,41	179,45	196,47
0,20	0,80	205,69	228,52	243,30	275,55
0,38	0,63	216,86	227,05	317,78	367,82
0,53	0,47	232,98	272,37	382,18	447,60
0,77	0,23	329,48	377,58	485,57	575,67
0,85	0,15	407,66	457,20	519,94	618,26
0,95	0,05	440,55	550,93	562,50	670,98
1	0	583,78	697,34	583,78	697,34

Finalmente, en Cedergreen *et al.* (2008) se analiza el sinergismo/antagonismo de más de 98 mezclas diferentes de pesticidas y fármacos sobre una gran variedad de bacterias, entre las que está incluida *Vibrio fischeri*. En el mencionado estudio se demuestra que las desviaciones sinérgicas son raras:

únicamente un 6% de mezclas analizadas mostraba de forma severa una sinergia ecotoxicológica. Además, se sugiere que solo en el caso de que en la mezcla se incluya un potencial agente sinérgico cabría esperar este último efecto. Por ende, es muy probable que la mezcla binaria Paracetamol/Edaravone contenga un agente de este tipo, en otras palabras, se trata de una mezcla de PhAC's para tener en cuenta como riesgo ambiental potencial.

#### 4.2.2. Estimaciones mediante los Modelos CA, IA e IAI.

La estimación de la concentración efectiva media de una mezcla binaria Paracetamol/Edaravone mediante el modelo CA (Concentration Addition),  $(EC_{50})_{mix,CA}$ , se ha obtenido aplicando la expresión [3.8].

En cambio, para hallar la concentración efectiva media de la mezcla binaria por el modelo IA, el procedimiento es un poco más laborioso ya que debe obtenerse mediante un proceso iterativo, como se ha mencionado en el apartado de “Materiales y Métodos”.

En primer lugar, deben encontrarse las curvas Concentración-Efecto de cada compuesto, que se han ajustado a la función de Weibull (ecuación [3.11]) y a la expresión [3.12], para los modelos IA e IAI, respectivamente. Los parámetros de ajuste  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\rho$  obtenidos son los que se recogen en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Parámetros de ajuste de las funciones sigmoides, de los modelos IA e IAI, para las curvas Concentración-Efecto de los fármacos Paracetamol y Edaravone.

	Modelo	$E_j(c_j) = F_j(c_j)$	Tiempo de ensayo	
		Función sigmoide	5 min	15 min
Paracetamol (j=1)	IA (Weibull)	$\alpha$	-6,23	-7,34
		$\beta$	2,11	2,44
	IAI	$\rho$	1,20	1,35
Edaravone (j=2)	IA (Weibull)	$\alpha$	-4,43	-4,81
		$\beta$	1,84	1,98
	IAI	$\rho$	0,97	1,10

En la Figura 4.8 se representan las curvas de ajuste de la función de Weibull (ecuación [3.11 ]) para el modelo IA a los 5 minutos y 15 minutos.

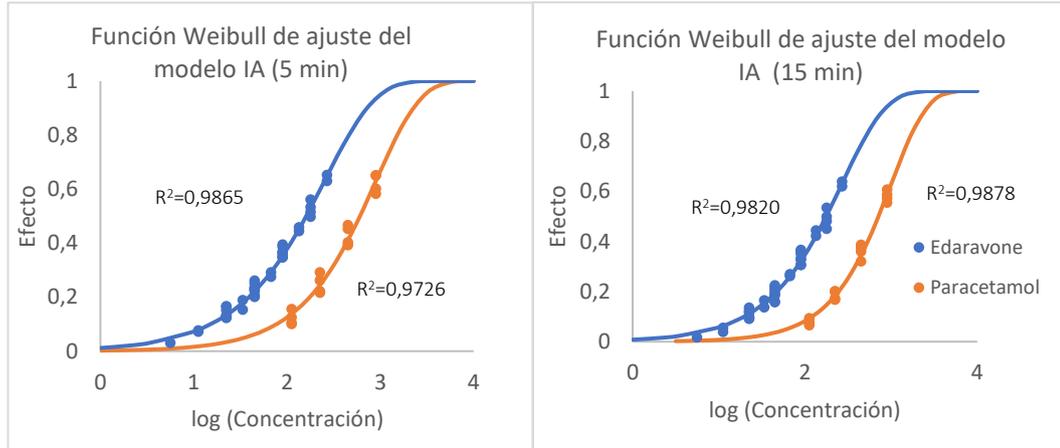


Figura 4.8. Curvas Concentración-Efecto de ambos fármacos a los 5 y 15 minutos (Función de Weibull).

Con relación al modelo IAI, como se ha mencionado en el apartado de “Materiales y Métodos”, se ha efectuado una linealización de la ecuación de ajuste [3.12] para hallar el parámetro  $\rho_j$ , dando como resultado la ecuación lineal [3.13], que gráficamente se representa en la Figura 4.9, para tiempos de exposición de 5 y 15 minutos.

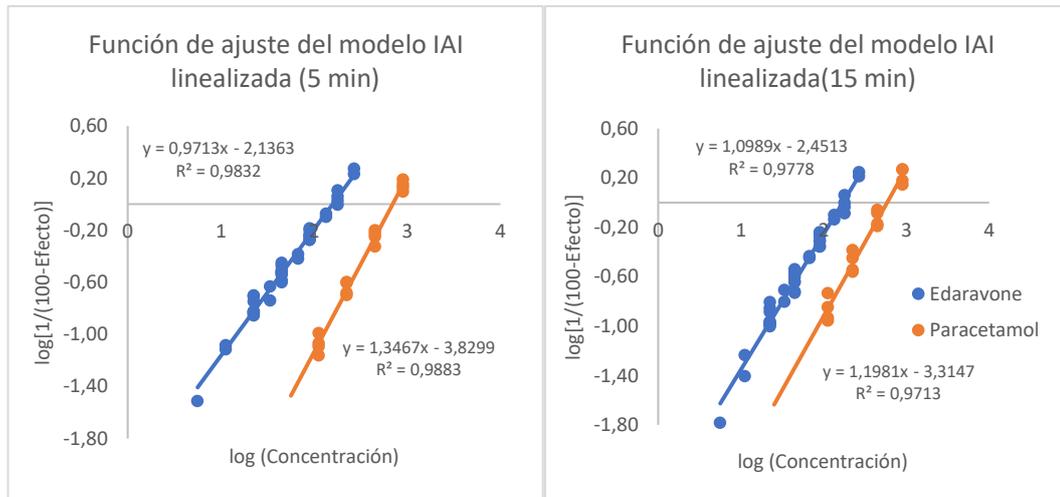


Figura 4.9. Linealización de la curva Concentración-Efecto de ambos fármacos a los 5 y 15 minutos (Función de ajuste modelo IAI).

Una vez conocidas las curvas Concentración-Efecto del Paracetamol y del Edaravone, se han encontrado por iteración los valores de concentración de la mezcla binaria que hacen que el efecto ecotoxicológico de esta mezcla sea 0,5 para una proporción relativa dada de Paracetamol/Edaravone, de acuerdo con la expresión [3.10], para el modelo IA y [3.15], para el modelo IAI. Estas concentraciones serán, por tanto, la  $(EC_{50})_{mix,IA}$  y la  $(EC_{50})_{mix,IAI}$ , respectivamente, para una proporción relativa dada de Paracetamol/Edaravone en la mezcla.

A continuación, en las Figuras 4.10 y 4.11 se presentan, en forma de gráfica, los resultados de ecotoxicidad media efectiva estimada mediante los modelos CA, IA e IAI, y los datos experimentales obtenidos, para tiempos de ensayo de 5 y 15 minutos.

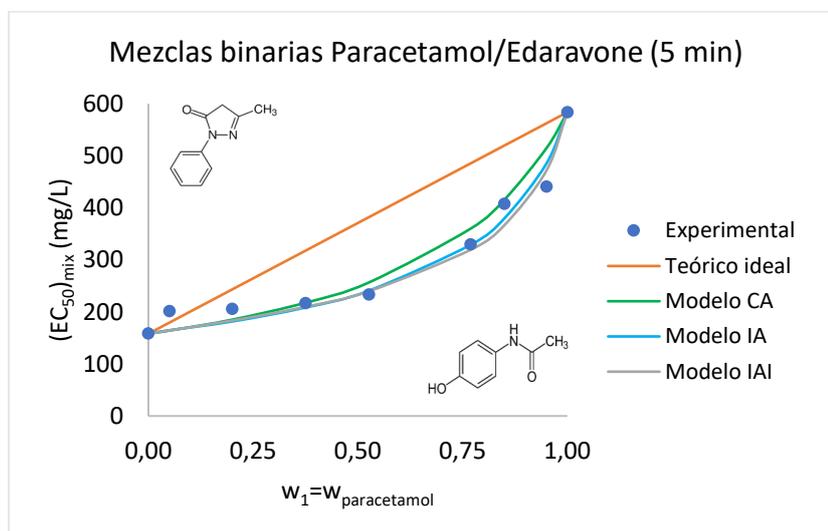


Figura 4.10.  $(EC_{50})_{\text{mix}}$  estimadas por los modelos CA, IA e IAI ( $t=5$  min)

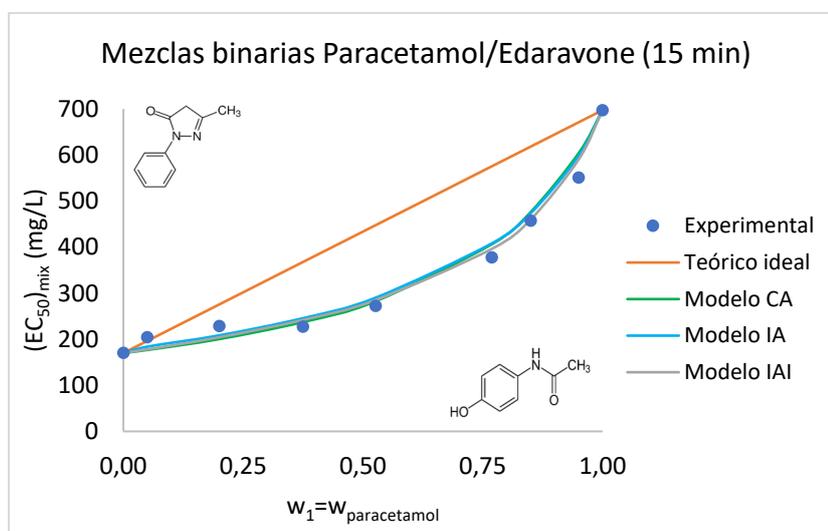


Figura 4.11.  $(EC_{50})_{\text{mix}}$  estimadas por los modelos CA, IA e IAI ( $t=15$  min)

Se observa que los dos modelos tradicionales poseen un gran poder de predicción de la ecotoxicidad de la mezcla. Sin embargo, parece haber una ligera discrepancia para  $t=5$  minutos: el modelo IA predice una mayor ecotoxicidad que el CA en un cierto intervalo ( $w_1 > 0,5$ ), esto concuerda con lo obtenido por Villa *et al.* (2014), aunque en otros estudios sucede justo lo contrario, como, por ejemplo, Backhaus *et al.* (2000) o Faust *et al.* (2003).

Por otro lado, en Backhaus *et al.* (2004) se afirma que los modelos CA e IA son equivalentes si se cumplen las siguientes condiciones: 1) la curva Concentración-Efecto de cada compuesto puede ser descrita por el modelo de Weibull, 2) estas curvas son paralelas y 3) que  $\beta$  sea aproximadamente 2,3.

A la vista de la Figura 4.8, se deduce que la segunda condición se verifica y, a partir de la Tabla 4.6, la tercera. Por tanto, ambos modelos son equivalentes, lo que explica la mínima diferencia en la ecotoxicidad estimada por ambos, ya que en este caso únicamente coexisten dos componentes (Villa *et al.*, 2014). Se espera que al aumentar el número de sustancias presentes en la mezcla disminuya aún más la varianza del modelo IA, como ya se ha constatado en compuestos narcóticos simples para el modelo CA (Cedergreen *et al.*, 2008).

En este último artículo, Cedergreen *et al.* (2008), encontramos un minucioso estudio acerca de la precisión de los modelos CA e IA. Entre las bacterias estudiadas se encuentran las *Vibrio fischeri*, para las cuales alrededor del 60% de los ensayos no pudieron ser descritos por ninguno de los dos modelos; aproximadamente un 15% con el IA, pero no con el CA; un 5% con el CA, pero no con el IA; y en torno a un 20% por ambos. Como consecuencia, surge la necesidad de refinar nuestras predicciones con otros modelos que reflejen la complejidad de los mecanismos de acción de forma más precisa, esto se abordará en apartados posteriores.

Es destacable que a bajas concentraciones de Paracetamol (menores de 5% en masa) ninguno de los tres modelos sea capaz de representar el antagonismo que se observa de forma experimental; por tanto, es en ese intervalo donde presentarán la mayor limitación. A pesar de eso, los tres modelos han logrado una muy buena predicción, con un coeficiente de determinación mayor de 0,95 en todos los casos. (Ver Tabla 4.7)

Tabla 4.7. Resumen de errores cometidos por los modelos CA, IA e IAI

	Error medio		Coeficiente de determinación, R <sup>2</sup>	
	5 min	15 min	5 min	15 min
Modelo CA	9,72%	7,93%	0,9679	0,9909
Modelo IA	7,30%	7,54%	0,9618	0,9893
Modelo IAI	7,88%	6,78%	0,9549	0,9877

Si realizamos un análisis de los errores (Tabla 4.7) respecto a los datos experimentales, el modelo CA es visiblemente el que peor poder de predicción posee, esto concuerda con Backhaus *et al.* (2000), quienes afirman que el modelo IA posee un mayor poder de predicción que el CA en mezclas binarias

con distintos mecanismos de acción, como es nuestro caso. El modelo IAI presenta un error medio ligeramente mayor que el modelo IA a los 5 minutos, pero para  $t=15$  minutos presenta un error medio de 6,78%, así que es el que menor discrepancia posee con los datos experimentales, es decir, presenta una mejora notable respecto a los modelos tradicionales (Rider *et al.*, 2005).

#### 4.2.3. Estimación por ajuste de datos experimentales con el modelo tipo van Laar

El resultado experimental presentado en las Figuras 4.6 y 4.7 sigue una curva que nos lleva a pensar que sería posible modelarla matemáticamente por medio de coeficientes de actividad ecotoxicológica, tal y como se indicó en el apartado 3.4.5, realizando una analogía con la ley de Raoult.

El modelado se efectúa sobre 3 puntos experimentales de la muestra (fracción másica de Paracetamol:  $w_1=0,05$ ;  $w_1=0,53$  y  $w_1=0,95$ ), de esta forma, se verificará la bondad de la predicción con el resto de las concentraciones.

Los parámetros resultantes, además del error y del coeficiente de determinación, se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Resumen de los parámetros del modelo tipo van Laar.

	$A_{12}$	$A_{21}$	Error medio	$R^2$
5 min	-0,6821	-18,0958	9,00%	0,9127
15 min	-0,6894	-14,1118	10,61%	0,9693

Las predicciones de las concentraciones efectivas medias,  $(EC_{50})_{mix,VL}$ , obtenidas con los parámetros de interacción binaria,  $A_{12}$  y  $A_{21}$  de la Tabla 4.8 y las ecuaciones [3.17], [3.18] y [3.19] se presentan en las Figuras 4.12 y 4.13.

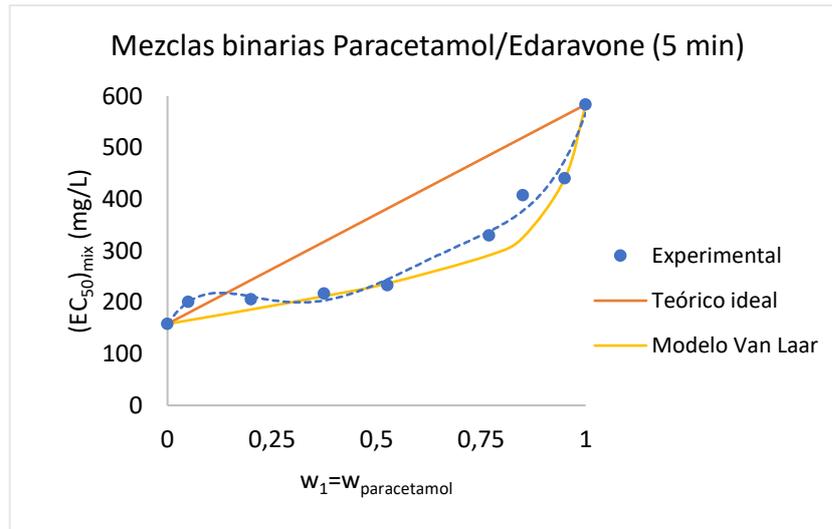


Figura 4.12.  $(EC_{50})_{\text{mix, VL}}$  estimadas por el modelo tipo van Laar ( $t=5$  min).

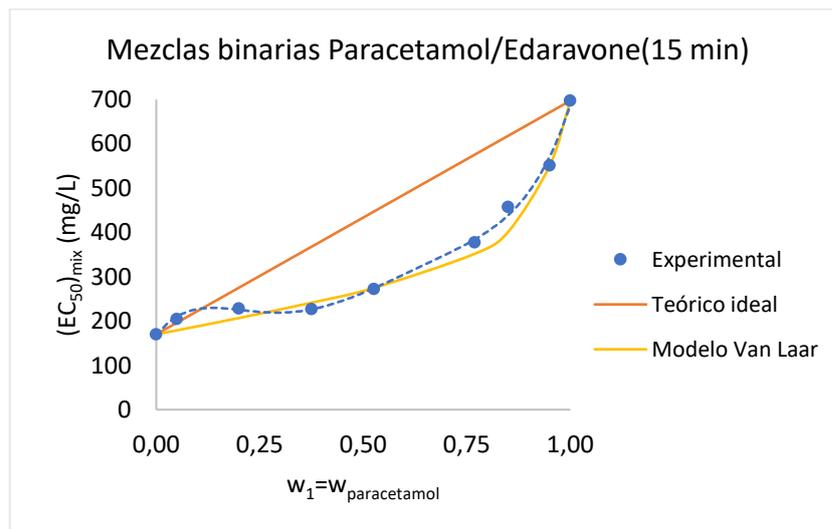


Figura 4.13.  $(EC_{50})_{\text{mix, VL}}$  estimadas por el modelo tipo van Laar ( $t=15$  min).

Como se puede apreciar, por medio de un ajuste a 3 puntos experimentales el modelo efectúa una predicción razonablemente buena, pero seguimos sin detectar el efecto antagónico que caracteriza la curva experimental a bajas concentraciones de Paracetamol (Figuras 4.12 y 4.13)

No tenemos constancia de que existan estudios en los que se proponga la ecuación tipo van Laar como modelo de predicción en ecotoxicología, por lo que no es posible contrastar nuestras predicciones con otras mezclas de fármacos.

#### 4.2.4. Estimación por ajuste de datos experimentales con el modelo ICIM

Como consecuencia de la imposibilidad de predecir hasta ahora el efecto antagónico de la curva experimental, se ha decidido investigar en la bibliografía con el objetivo de encontrar un nuevo modelo que, como veremos más adelante, sí sea capaz de hacerlo, este modelo es el ICIM, propuesto por Qin et al. (2011).

En las Figuras 4.14 y 4.15 se grafican las predicciones de las concentraciones efectivas medias estimadas con el modelo ICIM, empleando 3 datos experimentales como entrenamiento.

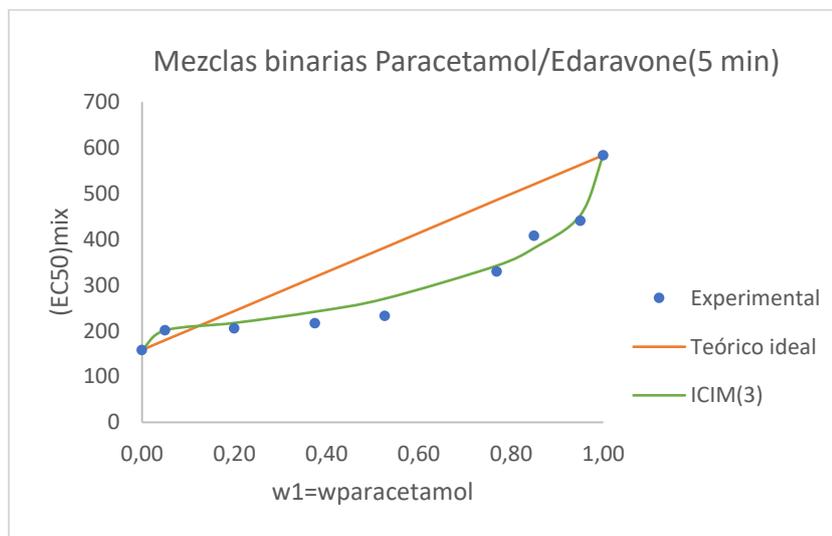


Figura 4.14.  $(EC_{50})_{mix,ICIM}$  estimada el modelo ICIM(3) (t=5 min)

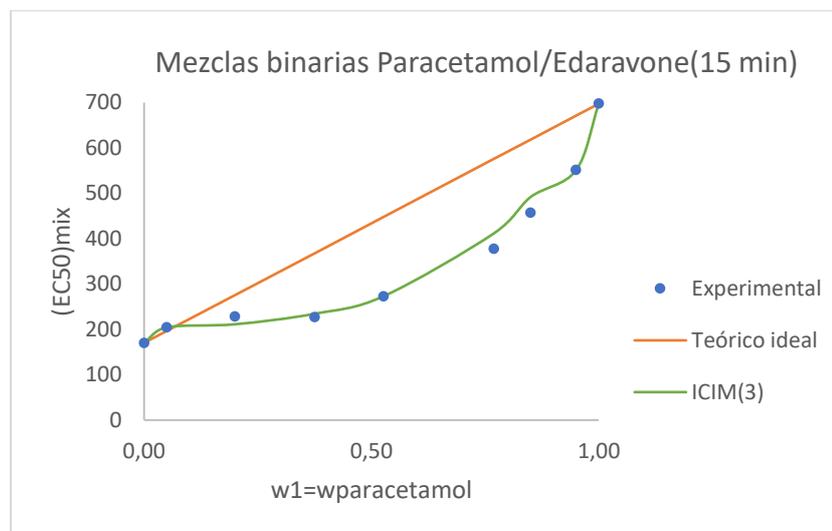


Figura 4.15.  $(EC_{50})_{mix,ICIM}$  estimada por el modelo ICIM(3) (t=15 min)

Se observa tanto a los 5 como a los 15 minutos (Figuras 4.14 y 4.15) un ajuste excelente del modelo. Además, en este caso, el modelo ICIM(3) predice el efecto antagónico de la curva experimental, a bajas concentraciones relativas de Paracetamol, con suficiente exactitud.

Tabla 4.9. Resumen de los parámetros del modelo ICIM(3).

	<b>b<sub>0</sub></b>	<b>b<sub>1</sub></b>	<b>b<sub>2</sub></b>	<b>Error medio</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
5 min	0,6696	0,2428	0,4942	5,51%	0,9640
15 min	2,1350	15,3710	-15,1767	3,93%	0,9857

Como puede apreciarse, el modelo predictivo ICIM(3), aunque precise de un mínimo de determinaciones experimentales, si lo comparamos con los modelos CA, IA, IAI y van Laar, conduce a estimaciones de  $EC_{50,mix}$  con menores errores medios. Qin et al. (2011) alcanzan resultados similares con mezclas de otros compuestos, en su mayoría herbicidas.

Asimismo, el modelo ICIM(3) es el único capaz de predecir el efecto antagónico de la curva experimental, algo que no había sucedido hasta ahora con ninguno de los modelos expuestos en este trabajo. Podemos afirmar que el modelo ICIM supone un aporte significativo en el campo de la cuantificación de la ecotoxicidad en mezclas.

Finalmente, con relación a la validación interna *leave-one-out* del ajuste completo a la curva experimental, los parámetros resultantes se encuentran en la Tabla A.6.3. del Anexo.



## 5. Conclusiones

Por medio del ensayo Microtox® se concluye que el fármaco Eदारavone está incluido en el grupo de “No tóxicos” de acuerdo con el sistema de clasificación GHS, mencionado en el apartado “Materiales y Métodos”. En cambio, si lo clasificamos por Unidades de Toxicidad (UT), se englobaría dentro de los compuestos “moderadamente tóxicos”.

Asimismo, cabe destacar que los resultados obtenidos para el Paracetamol coinciden con los obtenidos previamente por Ortiz *et al.* (2014), ya que ambos clasifican al fármaco como “No tóxico”, al poseer una  $EC_{50} > 100$  mg/L. Si atendemos a la clasificación por Unidades de Toxicidad (UT) el fármaco, se encuentra en el grupo de los “moderadamente tóxicos” para  $t=5$  minutos y en el de “ligeramente tóxicos” a los 15 minutos.

Para mezclas binarias Paracetamol/Edaravone, a fracciones másicas de Paracetamol por encima de 0,2 se concluye que existe una sinergia (aumento del efecto inhibitorio) entre ambos compuestos, ya que la mezcla en conjunto es más ecotóxica de lo esperado teóricamente. Sin embargo, para fracciones másicas de Paracetamol por debajo de este valor, existe una ligera acción antagonista (aumento del efecto estimulador).

Se ha desarrollado un nuevo modelo tipo van Laar para la estimación de propiedades ecotoxicológicas de la mezcla binaria Paracetamol/Edaravone, que ha ofrecido buenos resultados de predicción.

Finalmente, se han aplicado 3 modelos puros de predicción ecotoxicológica de la mezcla binaria Paracetamol/Edaravone (CA, IA e IAI) y 2 modelos combinados que requieren una mínima determinación experimental (van Laar e ICIM), encontrándose que la mejor predicción de los datos experimentales se obtiene con el modelo ICIM (Integrated Concentration Addition with Independent Action), ya que es el único que logra predecir tanto la sinergia como el antagonismo de las mezclas, además de obtener excelentes parámetros de ajuste.



## 6. Referencias bibliográficas

Abbas, M., M. Adil, S. Ehtisham-ul-Haque, B. Munir, M. Yameen, A. Ghaffar, G. A. Shar, M. A. Tahir and M. Iqbal. 2018. *Vibrio Fischeri* Bioluminescence Inhibition Assay for Ecotoxicity Assessment: A Review. *Science of The Total Environment*, 626(2018), 1295–1309. Disponible en:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718300871>

[Último acceso 27 de Octubre de 2018]

Altenburger, R., T. Backhaus, W. Boedeker, M. Faust, M. Scholze, and L. H. Grimme. 2000. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Wiley-Blackwell, 19(9), 2341–2347. Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620190926>

[Último acceso 21 de Noviembre de 2018]

Altenburger, R., H. Schmitt and G. Schüürmann. 2004. Algal toxicity of nitrobenzenes: Combined effect analysis as a pharmacological probe for similar modes of interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Wiley-Blackwell, 24(2), 324-333. Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/04-032R.1>

[Último acceso 21 de Noviembre de 2018]

Backhaus, T., R. Altenburger, W. Boedeker, M. Faust, M. Scholze and L. H. Grimme. 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(9), 2348–2356. Disponible en:

<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620190927>

[Último acceso 13 de Noviembre de 2018]

Backhaus, T., M. Faust, M. Scholze, P. Gramatica, M. Vighi and L. H. Grimme. 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 258–264. Disponible en:

<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/02-497>

[Último acceso 13 de Noviembre de 2018]



Cedergreen, N. A., M. Christensen, A. Kamper, P. Kudsk, S. K. Mathiassen, J. C. Streibig, and H. Sørensen. 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1621–1632. Disponible en:

<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/07-474.1>

[Último acceso 4 de Noviembre de 2018]

Cruz, M. P., 2018. Edaravone (Radicava): A Novel Neuroprotective Agent for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* 43(1), 25–28. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29290672>

[Último acceso 27 de Octubre de 2018]

Ebele, A. J., M. A. Abdallah, and S. Harrad. 2017. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the Freshwater Aquatic Environment. *Emerging Contaminants*, 3(2017), 1–16. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405665016300488>

[Último acceso 27 de Octubre de 2018]

Faust, M., R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi and L.H. Grimme. 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action, *Aquatic Toxicology*. Elsevier, 63(1), 43–63. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X02001339>

[Último acceso 3 de noviembre de 2018]

Henley, E. J. and J. D. Seader., 1990. *Operaciones de Separación por Etapas de Equilibrio En Ingeniería Química*. Reverté, S.A.

Hereber, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters* 131(2002), 5–17. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427402000413?via%3Dihub>

[Último acceso 27 de Octubre de 2018]

Irusta, R., S. A. Ortiz, G. Pinto and P. A. García. 2011. Evaluación ecotoxicológica de productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCP's) como medida para la prevención de la contaminación en ambientes acuáticos, *Fundación Mapfre*.

James, G., D. Witten, T. Hastie and R. Tibshirani. 2013. *An introduction to statistical learning: With applications in R*. Springer.

Mayo, K., K. Moran, W. Meylan, P. Ranslow, M. Lock, J. V. Nabholz, J. Von Runnen, L. M. Cassidy and J. Tunkel. 2017. *Operation Manual for the Ecological Structure-Activity Relationship Model (ECOSAR) Class Program*. [pdf] Disponible en:

[https://www.epa.gov/sites/production/files/201711/documents/operationmanual\\_v2.0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/201711/documents/operationmanual_v2.0.pdf).

[Último acceso 17 de Noviembre de 2018]

Naciones Unidas, 2011. *Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA)* [pdf] Disponible en:

[https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev4sp.pdf](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev4sp.pdf)

[Último acceso 27 de Octubre de 2018]

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2018. PubChem Compound Database; CID=4021. Disponible en:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4021>

[Último acceso 9 de Noviembre de 2018]

Olmstead, A. W. and LeBlanc, G. A., 2005. Toxicity Assessment of Environmentally Relevant Pollutant Mixtures Using a Heuristic Model, *Integrated Environmental Assessment and Management*, Wiley-Blackwell, 1(2), 114-122. Disponible en:

[https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1897/IEAM\\_2004-005R.1](https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1897/IEAM_2004-005R.1)

[Último acceso 13 de Noviembre de 2018]

Ortiz, S. A., G. Pinto, P. A. García, and R. Irusta. 2013. Consumption and Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products in the Aquatic Environment in Spain. *Science of The Total Environment*, 444(2013), 451-65. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712014830?via%3Dihub>

[Último acceso 19 de Febrero de 2018]

Ortiz, S. A., G. Pinto, P. A. García, and R. Irusta. 2014. Ecotoxicity and Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Aquatic Environments and Wastewater Treatment Plants. *Ecotoxicology* 23(8), 1517-33. Disponible en:

<http://link.springer.com/10.1007/s10646-014-1293-8>

[Último acceso 19 de Febrero de 2018]



Ortiz, S. A., P. A. García, and R. Irusta. 2016. Dose-response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products, *Ecotoxicology*. Springer US, 25(1), 141-162. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-015-1576-8>

[Último acceso 15 de Noviembre de 2018]

Peake, B. M., R. Braund, A. Y. C. Tong, and L. A. Tremblay. 2016. Impact of Pharmaceuticals on the Environment. *The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the Environment*, 1(5), 109-52. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-907568-25-1.00005-0>

[Último acceso 27 de Octubre de 2018]

Qin, L., S. Liu, J. Zhang and Q. Xiao. 2011. A novel model integrated concentration addition with independent action for the prediction of toxicity of multi-component mixture, *Toxicology*. Elsevier, 280(3), 164-172. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X10006682>

[Último acceso 9 de Noviembre de 2018]

Rider, C. V. and LeBlanc, G. A., 2005. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures, *Toxicological Sciences*, 87(2), 520-528. Disponible en:

<https://academic.oup.com/toxsci/article/87/2/520/1730749>.

[Último acceso 13 de Noviembre de 2018]

US EPA. 2012. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.11. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

Verhaar, H. J. M., van Leeuwen, C. J. and J. L. M. Hermens. 1992. Classifying environmental pollutants. *Chemosphere*. Pergamon, 25(4), 471-491. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0045653592902805>

[Último acceso 17 Noviembre de 2018]

Villa, S., Vighi, M. and Finizio, A., 2014. Experimental and predicted acute toxicity of antibacterial compounds and their mixtures using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*. 108(2014), 239-244. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351400112X>

[Último acceso 3 de Noviembre de 2018]



Vighi, M., S. Migliorati, and G. S. Monti. 2009., Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2009), 154–161.

Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.008>

[Último acceso 29 de Octubre de 2018]



## 7. Anexos.

### A.1. Ensayo Microtox® “Test Básico”.

- a) Situar cubetas limpias en los orificios desde A1 a C5 ( $15\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Colocar una cubeta en el orificio destinado a las bacterias ( $5,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) con 1000  $\mu\text{L}$  de la solución de reconstitución (agua desionizada ultrapura)
- b) Añadir 500  $\mu\text{L}$  de diluyente (NaCl al 2%) en las cubetas B1 a C5.
- c) Añadir 1500  $\mu\text{L}$  en las cubetas A1 a A4.
- d) Colocar 3000  $\mu\text{L}$  de la muestra a analizar en la cubeta A5 y agregar después 300  $\mu\text{L}$  de OAS (NaCl al 22%). Mezclar aspirando y descargando con la pipeta y descartar 1500  $\mu\text{L}$ .
- e) Preparar soluciones seriadas de forma que la relación de concentraciones de la muestra entre soluciones adyacentes sea 1:2. Para ello, se transfieren 1500  $\mu\text{L}$  desde A5 a A4, A4 a A3 y desde A3 a A2. Mezclar varias veces con la pipeta antes de cada transferencia.
- f) Retirar 1500  $\mu\text{L}$  de la cubeta A2. De esta manera, en la cubeta A1 solo se encuentra diluyente.

En este punto, las concentraciones de las soluciones en las cubetas son las siguientes:

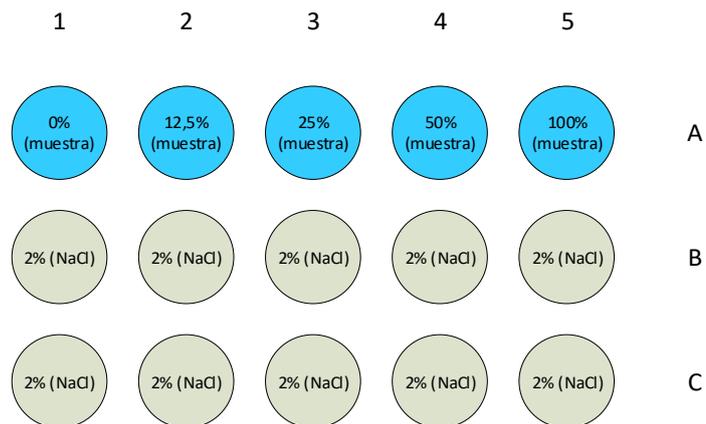


Figura A.1.1. Esquema cubetas Microtox®

- g) Esperar 5 minutos a que las soluciones se estabilicen en torno a la temperatura de trabajo ( $15^{\circ}\text{C}$ ).

- h) Tomar un vial de bacterias *Vibrio fischeri* y mezclar rápidamente con los 1000  $\mu\text{L}$  de la solución de reconstitución previamente enfriada. El objetivo es crear una suspensión de microorganismos.
- i) De inmediato transferir 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión a las cubetas B1 a B5 y C1 a C5.
- j) Esperar 15 minutos a que la emisión de luz llegue a un estado estacionario y medir la luminiscencia para el estado inicial.
- k) Transferir 500  $\mu\text{L}$  de solución de A1 a B1, de A2 a B2, de A3 a B3, de A4 a B4, de A5 a B5. Igualmente, transferir 500  $\mu\text{L}$  de solución de A1 a C1, de A2 a C2, de A3 a C3, de A4 a C4 y de A5 a C5.
- l) Medir la luminiscencia a los 5 minutos y 15 minutos. Las concentraciones después de ejecutar este paso vienen detalladas en la Figura A.1.2.

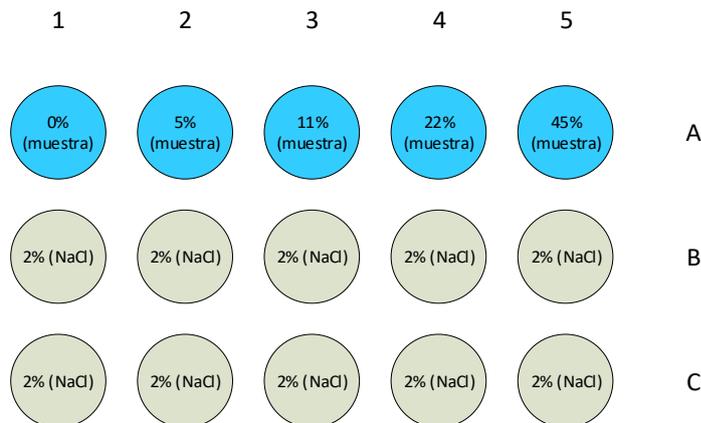


Figura A.1.2. Esquema cubetas Microtox®

## A.2. Hoja de resultados de ECOSAR™.

Tabla A.2.1. Resultados estimados para el compuesto Edaravone.

```

-----
ECOSAR v1.11 Class-specific Estimations
-----
Hydrazines
Amides

ECOSAR Class          Organism          Duration  End Pt  Predicted
=====
Hydrazines            : Fish            96-hr    LC50    1.052
Hydrazines            : Daphnid         48-hr    LC50    4.142
Hydrazines            : Green Algae     96-hr    EC50    0.297
Hydrazines            : Fish            96-hr    ChV     0.049 !
Hydrazines            : Daphnid         96-hr    ChV     0.253 !
Hydrazines            : Green Algae     96-hr    ChV     0.098

Amides                 : Fish            96-hr    LC50    20.625
Amides                 : Daphnid         48-hr    LC50    17.528
Amides                 : Green Algae     96-hr    EC50    0.732
Amides                 : Fish            96-hr    ChV     0.049
Amides                 : Daphnid         96-hr    ChV     1.425
Amides                 : Green Algae     96-hr    ChV     0.872
Amides                 : Fish (SW)       96-hr    LC50    18.322
Amides                 : Mysid (SW)      96-hr    LC50    1.384

=====
Neutral Organic SAR   : Fish            96-hr    LC50    44.754
(Baseline Toxicity)  : Daphnid         48-hr    LC50    26.766
                     : Green Algae     96-hr    EC50    24.710
                     : Fish            96-hr    ChV     4.651
                     : Daphnid         96-hr    ChV     3.016
                     : Green Algae     96-hr    ChV     7.264

Note: * = asterisk designates: Chemical may not be soluble enough to

```

Tabla A.2.2. Resultados estimados para el compuesto Paracetamol.

```

-----
ECOSAR v1.11 Class-specific Estimations
-----
Phenols
Amides
Phenol Amines

ECOSAR Class          Organism          Duration  End Pt  Predicted
=====
Phenols               : Fish            96-hr    LC50    388.874
Phenols               : Daphnid         48-hr    LC50    58.976
Phenols               : Green Algae     96-hr    EC50    315.037
Phenols               : Fish            96-hr    ChV     31.330
Phenols               : Daphnid         96-hr    ChV     11.247
Phenols               : Green Algae     96-hr    ChV     150.915
Phenols               : Fish (SW)       96-hr    LC50    232.600
Phenols               : Earthworm       14-day   LC50    598.633
Phenols               : Lemna gibba     7-day    EC50    407.783

Amides                 : Fish            96-hr    LC50    570.176
Amides                 : Daphnid         48-hr    LC50    1276.330
Amides                 : Green Algae     96-hr    EC50    12.862
Amides                 : Fish            96-hr    ChV     0.391
Amides                 : Daphnid         96-hr    ChV     25.903
Amides                 : Green Algae     96-hr    ChV     6.309
Amides                 : Fish (SW)       96-hr    LC50    495.830
Amides                 : Mysid (SW)      96-hr    LC50    19.291

Phenol Amines         : Fish            96-hr    LC50    25.146
Phenol Amines         : Daphnid         48-hr    LC50    1.513
Phenol Amines         : Green Algae     96-hr    EC50    11.464
Phenol Amines         : Fish            96-hr    ChV     2.128 !
Phenol Amines         : Daphnid         96-hr    ChV     1.002
Phenol Amines         : Green Algae     96-hr    ChV     1.554

=====
Neutral Organic SAR   : Fish            96-hr    LC50    3000.054
(Baseline Toxicity)  : Daphnid         48-hr    LC50    1477.661
                     : Green Algae     96-hr    EC50    611.425
                     : Fish            96-hr    ChV     247.963
                     : Daphnid         96-hr    ChV     97.009
                     : Green Algae     96-hr    ChV     116.660

```

### A.3. Resultados del estudio ecotoxicológico mediante el ensayo de bioluminiscencia.

Tabla A.3.1. Resultados del ensayo Microtox® para la solución patrón de Sulfato de Zinc (50 mg/L)

Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> )					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
0,75	-0,81	0,12	5,63	13,38	56,92
1,05	-0,40	0,49	11,25	28,38	75,72
1,35	-0,06	0,74	22,50	46,10	84,43
1,65	0,20	0,93	45,00	61,02	89,48
0,45	-1,42	-0,22	2,81	3,58	36,79
0,75	-0,74	0,23	5,63	15,45	63,05
1,05	-0,43	0,46	11,25	26,89	73,97
1,35	-0,23	0,65	22,50	36,84	81,60
0,75	-0,79	0,27	5,63	13,89	65,21
1,05	-0,40	0,67	11,25	28,51	82,33
1,35	-0,02	0,94	22,50	48,53	89,80
1,65	0,14	1,03	45,00	58,03	91,36
0,75	-0,79	0,22	5,63	13,97	62,61
1,05	-0,43	0,50	11,25	27,12	76,14
1,35	-0,29	0,64	22,50	33,89	81,23
1,65	0,15	0,98	45,00	56,00	89,65
0,45	-0,99	-0,19	2,81	9,26	38,92
0,75	-0,60	0,21	5,63	19,82	61,40
1,05	-0,30	0,52	11,25	33,03	76,54
1,35	0,01	0,82	22,50	50,05	86,73
0,45	-1,44	-0,31	2,81	3,40	32,77
0,75	-0,76	0,17	5,63	14,64	59,53
1,05	-0,42	0,45	11,25	27,23	73,62
1,35	-0,06	0,80	22,50	46,33	86,33
0,45	-0,89	-0,16	2,81	11,10	40,03
0,75	-0,61	0,19	5,63	19,73	60,54
1,05	-0,37	0,41	11,25	29,57	71,76
1,35	-0,08	0,68	22,50	45,36	82,82

Tabla A.3.2. Resultados del ensayo Microtox® para la solución patrón de Triclosán (4,8 mg/L)

Triclosán					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
-0,57	-0,19	-0,30	0,27	39,18	33,62
-0,27	0,39	0,40	0,54	71,22	71,29
0,03	1,11	1,34	1,08	92,73	95,66
0,33	1,87	2,14	2,16	98,68	99,29
-0,57	-0,15	-0,24	0,27	41,15	36,24
-0,27	0,41	0,40	0,54	72,08	71,71
0,03	1,25	1,52	1,08	94,63	97,05
0,33	1,89	2,15	2,16	98,74	99,29
-0,57	-0,17	-0,27	0,27	40,12	35,01
-0,27	0,39	0,41	0,54	71,21	72,07
0,03	1,21	1,48	1,08	94,16	96,80
0,33	1,74	1,99	2,16	98,20	98,98
-0,57	-0,27	-0,11	0,27	34,73	43,40
-0,27	0,18	0,43	0,54	59,93	72,79
0,03	0,88	1,17	1,08	88,38	93,70
0,33	1,16	1,48	2,16	93,42	96,82
-0,57	-0,24	-0,12	0,27	36,45	42,91
-0,27	0,19	0,41	0,54	60,59	71,69
0,03	0,83	1,10	1,08	87,01	92,62
0,33	1,05	1,34	2,16	91,87	95,61

Tabla A.3.3. Resultados del ensayo Microtox® para el fármaco Paracetamol.

Paracetamol (acetaminofén)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
2,05	-0,96	-1,16	112,50	9,97	6,43
2,35	-0,56	-0,70	225,00	21,53	16,68
2,65	-0,19	-0,33	450,00	39,25	32,02
2,95	0,15	0,09	900,00	58,25	55,40
2,05	-0,85	-1,10	112,50	12,43	7,43
2,35	-0,45	-0,61	225,00	26,15	19,83
2,65	-0,08	-0,20	450,00	45,17	38,61
2,95	0,27	0,19	900,00	64,92	60,67
2,05	-0,73	-0,99	112,50	15,57	9,26
2,35	-0,38	-0,60	225,00	29,17	20,15
2,65	-0,06	-0,25	450,00	46,59	35,91
2,95	0,27	0,15	900,00	65,04	58,61
2,05	-0,93	-1,07	112,50	10,47	7,86
2,35	-0,55	-0,68	225,00	22,15	17,18
2,65	-0,17	-0,23	450,00	40,23	37,30
2,95	0,18	0,13	900,00	60,10	57,22

Tabla A.3.4. Resultados del ensayo Microtox® para el fármaco Edaravone.

Edaravone					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,35	-0,82	-0,96	1,35	-0,82	-0,96
1,65	-0,59	-0,73	1,65	-0,59	-0,73
1,95	-0,27	-0,36	1,95	-0,27	-0,36
2,26	-0,01	-0,09	2,26	-0,01	-0,09
1,35	-0,70	-0,81	1,35	-0,70	-0,81
1,65	-0,52	-0,63	1,65	-0,52	-0,63
1,95	-0,24	-0,27	1,95	-0,24	-0,27
1,35	-0,86	-0,99	1,35	-0,86	-0,99
1,65	-0,54	-0,60	1,65	-0,54	-0,60
1,95	-0,25	-0,31	1,95	-0,25	-0,31
1,35	-0,83	-1,00	1,35	-0,83	-1,00
1,65	-0,53	-0,65	1,65	-0,53	-0,65
1,95	-0,24	-0,30	1,95	-0,24	-0,30
2,26	0,06	0,00	2,26	0,06	0,00
1,35	-0,84	-0,98	1,35	-0,84	-0,98
1,65	-0,60	-0,72	1,65	-0,60	-0,72
1,95	-0,28	-0,36	1,95	-0,28	-0,36
2,26	0,03	-0,03	2,26	0,03	-0,03
1,35	-0,71	-0,86	1,35	-0,71	-0,86
1,65	-0,45	-0,54	1,65	-0,45	-0,54
1,95	-0,20	-0,25	1,95	-0,20	-0,25
2,26	0,11	0,06	2,26	0,11	0,06
1,05	-1,08	-1,40	1,05	-1,08	-1,40
1,35	-0,75	-0,89	1,35	-0,75	-0,89
1,65	-0,47	-0,58	1,65	-0,47	-0,58
1,95	-0,19	-0,24	1,95	-0,19	-0,24
0,75	-1,51	-1,78	0,75	-1,51	-1,78
1,05	-1,12	-1,23	1,05	-1,12	-1,23
1,35	-0,83	-0,97	1,35	-0,83	-0,97
1,65	-0,51	-0,56	1,65	-0,51	-0,56
1,53	-0,74	-0,80	1,53	-0,74	-0,80
1,83	-0,42	-0,45	1,83	-0,42	-0,45
2,13	-0,10	-0,14	2,13	-0,10	-0,14
2,43	0,23	0,21	2,43	0,23	0,21
1,53	-0,63	-0,71	1,53	-0,63	-0,71
1,83	-0,39	-0,43	1,83	-0,39	-0,43
2,13	-0,07	-0,10	2,13	-0,07	-0,10
2,43	0,27	0,25	2,43	0,27	0,25

Tabla A.3.5. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla Paracetamol (5%)/Edaravone (95%) (w/w).

Paracetamol (5%)/Edaravone (95%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,54	-0,73	-0,79	34,97	15,68	13,94
1,84	-0,53	-0,43	69,95	22,75	27,27
2,15	nd	nd	139,90	nd	nd
2,45	0,11	0,14	279,79	56,18	57,91
1,54	nd	nd	34,97	nd	nd
1,84	-0,49	-0,51	69,95	24,24	23,27
2,15	-0,20	-0,23	139,90	38,66	36,67
2,45	0,13	0,11	279,79	57,26	56,30
1,54	-0,57	-0,70	34,97	21,02	16,77
1,84	-0,35	-0,39	69,95	30,64	28,77
2,15	-0,13	-0,15	139,90	42,58	41,69
2,45	0,23	0,19	279,79	62,83	61,00
1,54	-0,73	-0,79	34,97	15,68	13,94
1,84	-0,53	-0,43	69,95	22,75	27,27
2,15	nd	nd	139,90	nd	nd
2,45	0,11	0,14	279,79	56,18	57,91

nd: valor no disponible

Tabla A.3.6. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla Paracetamol (20%)/Edaravone (80%) (w/w)

Paracetamol (20%)/Edaravone (80%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,59	-0,82	-0,91	39,24	13,11	10,89
1,89	-0,45	-0,62	78,49	26,40	19,04
2,20	-0,14	-0,17	156,98	41,89	40,28
2,50	0,13	0,05	313,95	57,47	52,85
1,59	-0,50	-0,57	39,24	23,84	21,29
1,89	nd	nd	78,49	nd	nd
2,20	-0,07	-0,06	156,98	45,56	46,45
2,50	nd	nd	313,95	nd	nd
1,59	-0,82	-0,91	39,24	13,22	10,91
1,89	-0,40	-0,47	78,49	28,49	25,44
2,20	-0,12	-0,15	156,98	43,22	41,34
2,50	0,24	0,20	313,95	63,64	61,36

nd: valor no disponible.

Tabla A.3.7. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla  
Paracetamol (37,5%)/Edaravone (62,5%) (w/w)

Paracetamol (37,5%)/Edaravone (62,5%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,66	-0,61	-0,75	45,76	19,77	15,04
1,96	-0,36	-0,48	91,53	30,47	24,97
2,26	-0,04	-0,09	183,05	47,74	44,66
2,56	0,31	0,23	366,10	67,06	63,14
1,66	-0,75	-0,91	45,76	14,96	10,99
1,96	-0,37	-0,36	91,53	29,67	30,51
2,26	-0,09	-0,10	183,05	45,04	44,14
2,56	0,23	0,22	366,10	63,01	62,32
1,66	-0,71	-0,53	45,76	16,17	22,66
1,96	-0,48	-0,44	91,53	24,94	26,39
2,26	-0,15	-0,10	183,05	41,62	44,44
2,56	0,21	0,21	366,10	61,86	61,81
1,66	-0,61	-0,75	45,76	19,77	15,04
1,96	-0,36	-0,48	91,53	30,47	24,97
2,26	-0,04	-0,09	183,05	47,74	44,66
2,56	0,31	0,23	366,10	67,06	63,14

Tabla A.3.8. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla  
Paracetamol (53%)/Edaravone (47%) (w/w)

Paracetamol (53%)/Edaravone (47%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,73	-0,67	-0,89	53,44	17,63	11,45
2,03	-0,41	-0,51	106,88	27,81	23,74
2,33	-0,10	-0,16	213,75	44,41	40,94
2,63	0,28	0,22	427,50	65,36	62,66
1,73	-0,64	-0,74	53,44	18,73	15,45
2,03	-0,32	-0,42	106,88	32,11	27,50
2,33	-0,01	-0,08	213,75	49,15	45,52
2,63	0,34	0,27	427,50	68,48	64,89
1,73	-0,81	-1,01	53,44	13,28	8,97
2,03	-0,41	-0,56	106,88	27,86	21,58
2,33	-0,05	-0,14	213,75	47,26	41,91
2,63	0,30	0,22	427,50	66,53	62,42
1,73	-0,67	-0,89	53,44	17,63	11,45
2,03	-0,41	-0,51	106,88	27,81	23,74
2,33	-0,10	-0,16	213,75	44,41	40,94
2,63	0,28	0,22	427,50	65,36	62,66

Tabla A.3.9. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla Paracetamol (77%)/Edaravone (23%) (w/w)

Paracetamol (77%)/Edaravone (23%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,86	-1,01	-1,26	73,13	8,87	5,23
2,17	-0,54	-0,60	146,25	22,19	20,16
2,47	-0,17	-0,23	292,50	40,06	36,81
2,77	0,17	0,15	585,00	59,67	58,58
1,86	-0,74	-0,92	73,13	15,45	10,69
2,17	-0,35	-0,45	146,25	30,98	26,13
2,47	-0,01	-0,09	292,50	49,57	44,53
2,77	0,33	0,27	585,00	68,31	65,06
1,86	-0,66	-0,85	73,13	18,10	12,46
2,17	-0,31	-0,46	146,25	32,68	25,95
2,47	0,02	-0,09	292,50	50,86	44,72
2,77	0,36	0,27	585,00	69,59	65,31
1,86	-1,01	-1,26	73,13	8,87	5,23
2,17	-0,54	-0,60	146,25	22,19	20,16
2,47	-0,17	-0,23	292,50	40,06	36,81
2,77	0,17	0,15	585,00	59,67	58,58

Tabla A.3.10. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla Paracetamol (85%)/Edaravone (15%) (w/w)

Paracetamol (85%)/Edaravone (15%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
1,92	-0,72	-0,85	83,36	15,92	12,29
2,22	-0,36	-0,45	166,73	30,58	26,08
2,52	0,02	-0,06	333,45	51,24	46,41
2,82	0,37	0,31	666,90	69,93	67,13
1,92	-0,97	nd	83,36	9,77	nd
2,22	-0,56	-0,74	166,73	21,63	15,45
2,52	-0,12	-0,20	333,45	43,21	38,78
2,82	0,29	0,24	666,90	65,90	63,21
1,92	-0,94	-0,97	83,36	10,28	9,56
2,22	-0,60	-0,70	166,73	20,24	16,51
2,52	-0,25	-0,26	333,45	35,84	35,21
2,82	0,18	0,15	666,90	60,35	58,16
1,92	-0,72	-0,85	83,36	15,92	12,29
2,22	-0,36	-0,45	166,73	30,58	26,08
2,52	0,02	-0,06	333,45	51,24	46,41
2,82	0,37	0,31	666,90	69,93	67,13

nd: valor no disponible.

Tabla A.3.11. Resultados del ensayo Microtox® para la mezcla Paracetamol (95%)/Edaravone (5%) (w/w)

Paracetamol (95%)/Edaravone (5%) (w/w)					
log(C <sub>i</sub> )	log (Γ <sub>i</sub> )		C <sub>i</sub> (mg/L)	Efecto (%)	
	t=5 min	t=15 min		t=5 min	t=15 min
2,04	-0,62	-0,79	108,56	19,04	13,91
2,34	-0,34	-0,53	217,13	31,40	22,88
2,64	0,08	-0,06	434,25	54,43	46,32
2,94	0,36	0,26	868,50	69,78	64,61
2,04	-0,57	-0,72	108,56	21,21	16,11
2,34	-0,20	-0,30	217,13	38,66	33,16
2,64	0,10	0,00	434,25	55,65	49,76
2,94	0,47	0,40	868,50	74,73	71,31
2,04	nd	nd	108,56	nd	nd
2,34	-0,75	nd	217,13	15,00	nd
2,64	-0,19	-0,46	434,25	39,07	25,63
2,94	0,24	0,10	868,50	63,43	55,51
2,04	-0,62	-0,79	108,56	19,04	13,91
2,34	-0,34	-0,53	217,13	31,40	22,88
2,64	0,08	-0,06	434,25	54,43	46,32
2,94	0,36	0,26	868,50	69,78	64,61

nd: valor no disponible.

#### A.4. Resultados asociados a los modelos CA, IA e IAI.

Tabla A.4.1. Concentraciones efectivas medias estimadas por el modelo CA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sus errores relativos (%) respecto a los datos experimentales.

$w_1(w/w)$	Modelo CA (Concentration Addition)			
	5 minutos		15 minutos	
	$(EC_{50})_{\text{mix,CA}}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>	$(EC_{50})_{\text{mix,CA}}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>
0,05	164,16	22,47%	176,79	13,52%
0,20	185,17	11,08%	200,41	12,30%
0,38	217,69	0,38%	237,42	4,57%
0,53	256,66	9,23%	282,53	3,73%
0,77	360,15	8,52%	406,55	7,67%
0,85	415,91	1,98%	476,03	4,12%
0,95	514,56	14,38%	603,77	9,59%

<sup>1</sup> Relativo a la concentración efectiva media experimental.

Tabla A.4.2. Concentraciones efectivas medias estimadas por el modelo IA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sus errores relativos (%) respecto a los datos experimentales.

$w_1(w/w)$	Modelo IA (Independent Action)							
	5 minutos				15 minutos			
	$E_1^*$	$E_2^{**}$	$(EC_{50})_{\text{mix,IA}}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>	$E_1^*$	$E_2^{**}$	$(EC_{50})_{\text{mix,IA}}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>
0,05	0,01	0,49	164,85	18,34%	0,01	0,50	183,94	13,52%
0,20	0,05	0,47	181,71	9,98%	0,03	0,48	208,40	12,30%
0,38	0,10	0,44	208,47	0,38%	0,08	0,46	245,73	4,57%
0,53	0,15	0,41	240,79	10,16%	0,13	0,43	290,16	3,73%
0,77	0,27	0,32	329,06	9,31%	0,25	0,33	408,26	7,67%
0,85	0,32	0,26	380,03	2,02%	0,31	0,27	473,42	4,12%
0,95	0,42	0,14	485,01	16,80%	0,42	0,14	597,82	9,59%

<sup>1</sup> Relativo a la concentración efectiva media experimental.

\* Efecto estimado por la función de Weibull del componente 1.

\*\* Efecto estimado por la función de Weibull del componente 2.

Tabla A.4.3. Concentraciones efectivas medias estimadas por el modelo IAI (Integrated Addition and Interaction) ( $\text{mg/L}^1$ ) y sus errores relativos (%) respecto a los datos experimentales.

$w_1(w/w)$	Modelo IAI (Integrated addition and interaction)			
	5 minutos		15 minutos	
	$(EC_{50})_{\text{mix,IAI}}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>	$(EC_{50})_{\text{mix,IAI}}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>
0,05	164,44	18,21%	178,14	12,85%
0,20	183,46	10,81%	204,31	10,59%
0,38	209,88	3,22%	242,11	6,63%
0,53	239,73	2,90%	285,02	4,65%
0,77	319,46	3,04%	396,39	4,98%
0,85	366,99	9,98%	460,00	0,61%
0,95	471,47	7,02%	590,15	7,12%

<sup>1</sup> Relativo a la concentración efectiva media experimental.

### A.5. Cálculos y errores asociados a la estimación mediante el modelo tipo van Laar.

El primer paso es plantear la ecuación que expresa la concentración efectiva media de la mezcla según coeficientes de actividad “ecotoxicológicos”, ecuación [A.5.1].

$$[EC_{50}(w_j)]_{mix,VL} = \sum_{j=1}^2 (EC_{50})_{j,exp} \cdot \gamma_j' \cdot w_j \quad [A.5.1]$$

Nota: para no modificar la notación de la ecuación de van Laar y continuando con lo propuesto hasta ahora en apartados previos, reservamos el subíndice 1 al Paracetamol y el 2 para el Edaravone.

Los coeficientes de actividad se hallan a partir de la ecuación de van Laar para cada componente (ecuaciones [A.5.2] y [A.5.3]).

$$\ln(\gamma_1') = A_{12} \left[ \frac{A_{21}w_2}{A_{12}w_1 + A_{21}w_2} \right]^2 \quad [A.5.2]$$

$$\ln(\gamma_2') = A_{12} \left[ \frac{A_{21}w_2}{A_{12}w_1 + A_{21}w_2} \right]^2 \quad [A.5.3]$$

Aplicamos las ecuaciones [A.5.2] y [A.5.3] para cada fracción másica. Se observa que las incógnitas son los coeficientes de interacción binaria  $A_{12}$  y  $A_{21}$ .

A continuación, procedemos a obtener la ecuación de ajuste con ayuda del complemento Solver de Microsoft Excel. Para ello, empleamos la función objetivo (FO) dada por la ecuación [A.5.4], es decir, realizamos un ajuste por mínimos cuadrados a los datos experimentales cambiando los coeficientes de interacción binaria.

$$FO = MIN \left[ \sum_{i=1}^3 \left( [EC_{50}(w_j)]_{mix,exp} - [EC_{50}(w_j)]_{mix,VL} \right)_i^2 \right] \quad [A.5.4]$$

Donde:

$[EC_{50}(w_j)]_{mix,exp}$ : concentración efectiva media experimental a una fracción másica  $w_j$ .

$[EC_{50}(w_j)]_{mix,VL}$ : concentración efectiva media estimada a partir de la ecuación tipo van Laar a una fracción másica  $w_j$ .

Una vez que conocemos los coeficientes de interacción binaria, ya estamos en condiciones de hallar la ecotoxicidad estimada por la ecuación de tipo van Laar. Recordemos que este ajuste se realiza en la práctica sobre tres puntos (fracción másica de Paracetamol:  $w_1=0,05$ ;  $w_1=0,53$  y  $w_1=0,95$ ), el resto nos sirven de validación del modelo.

Los resultados para  $t=5$  minutos y  $t=15$  minutos se presentan en las Tablas A.5.2 y A.5.3, respectivamente.

Tabla A.5.1. Resultados modelo tipo van Laar para  $t=5$  minutos.

$w_1(w/w)$	$\gamma'_1$	$\gamma'_2$	$[EC_{50}(w_j)]_{mix,VL}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>
0,05	0,5069	0,9999	165,05	17,90%
0,20	0,5120	0,9984	186,12	9,51%
0,38	0,5209	0,9912	212,02	2,23%
0,53	0,5335	0,9712	236,68	1,59%
0,77	0,5837	0,7982	291,27	11,60%
0,85	0,6293	0,5709	325,83	20,07%
0,95	0,7933	0,0428	440,28	0,06%

<sup>1</sup> Relativo a la concentración efectiva media experimental

Tabla A.5.2. Resultados modelo tipo van Laar para  $t=15$  minutos.

$w_1(w/w)$	$\gamma'_1$	$\gamma'_2$	$[EC_{50}(w_j)]_{mix,VL}$ (mg/L)	Error <sup>1</sup>
0,05	0,5037	0,9999	179,14	10,89%
0,20	0,5103	0,9979	206,97	0,62%
0,38	0,5217	0,9886	241,53	11,38%
0,53	0,5378	0,9633	275,01	18,04%
0,77	0,6006	0,7583	351,94	6,82%
0,85	0,6552	0,5151	401,49	1,51%
0,95	0,8308	0,0380	550,68	25,00%

<sup>1</sup> Relativo a la concentración efectiva media experimental.

## A.6. Resultados asociados al modelo ICIM y a su validación.

Tabla A.6.1. Ajustes al modelo ICIM(3) para t=5 minutos.

$w_1(w/w)$	$\log((EC_{50})_{mix,CA})$	$\log((EC_{50})_{mix,IA})$	$(EC_{50})_{mix,ICIM}$ (mg/L)
0,05	2,2153	2,2171	201,0196
0,53	2,4094	2,3816	270,2016
0,95	2,7114	2,6857	452,2041

Tabla A.6.2. Ajustes al modelo ICIM(3) para t=15 minutos.

$w_1(w/w)$	$\log((EC_{50})_{mix,CA})$	$\log((EC_{50})_{mix,IA})$	$(EC_{50})_{mix,ICIM}$ (mg/L)
0,05	2,2474	2,2647	204,4141
0,53	2,4511	2,4626	272,8551
0,95	2,7809	2,7766	550,6263

Tabla A.6.3. Validación del modelo ICIM\* para t=5 minutos y 15 minutos.

i	$w_1(w/w)$	t= 5 minutos		t=15 minutos	
		$\log((EC_{50})'_{mix,ICIM})_i$	$MSE_i$	$\log((EC_{50})'_{mix,ICIM})_i$	$MSE_i$
1	0,05	2,2487	2,98E-03	2,3050	3,05E-05
2	0,20	2,3086	2,12E-05	2,3192	1,58E-03
3	0,38	2,3605	5,93E-04	2,3924	1,31E-03
4	0,53	2,4172	2,48E-03	2,4430	6,13E-05
5	0,77	2,5101	5,94E-05	2,6023	6,38E-04
6	0,85	2,5435	4,46E-03	2,6674	5,39E-05
7	0,95	2,8650	4,89E-02	2,6962	2,02E-03
		<b>CV (5 min) =</b>	<b>8,49E-03</b>	<b>CV (15 min) =</b>	<b>8,13E-04</b>

\* La validación por medio del método LOOCV (leave-one-out cross validation) se realiza con la muestra completa (N=7).