



# EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE EXTRACTOS DE LODOS CON POTENCIAL USO AGRÍCOLA Y ENERGÉTICO

**Eduardo de la Peña de Torres**

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Investigador del CSIC**

**Presidente de Honor de la AETOX**

Coordinador de la *Red Iberoamericana de Toxicología y Seguridad Química RITSQ*

**Miembro de Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal REMA**

c/ Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid – España



Mi sincero agradecimiento  
a la **Dra. Nancy Patiño**  
sus buen hacer ha permitido  
mi presencia de nuevo en la  
Universidad Nacional de  
Colombia





S. BOLIVAR.

EL 26 DE MAYO DE 1802  
 EN LA PARRQUIA DE SAN JOSE  
 QUE SE LEVANTABA EN EL SOLAR  
 QUE OCUPA ESTA CASA  
 SIMON BOLIVAR CONTRAJO MATRIMONIO  
 CON MARIA TERESA DEL TORO  
 MAYO 1969

## RUTAS GUIADAS - EL PARQUE DEL OESTE



### 11 Simón Bolívar



- 1 - General Manuel Cassola
- 2 - José Gervasio Artigas
- 3 - General San Martín
- 4 - Fuente de la Salud
- 5 - Doctor Federico Rubio
- 6 - Mariscal Andrés de Santa Cruz
- 7 - Periodista José Ignacio Rivero
- 8 - Restos de la Guerra Civil
- 9 - Avistamiento de Aves
- 10 - General Bernardo de O'Higgins
- 11 - Simón Bolívar
- 12 - Homenaje al Maestro
- 13 - Miguel Hidalgo
- 14 - Escritora Elena Fortun
- 15 - Manantial de la Salud
- 16 - Miguel Hernández
- 17 - Concepción Arenal
- 18 - Puerta de Madrid
- 19 - Juan Montalvo
- 20 - Mapa Orográfico
- 21 - Eugenio Espejo
- 22 - Juan Pablo Duarte
- 23 - Eugenio María de Hostos

A LA CIUDAD DE MURCIA, EN CUYO  
GLORIOSO REGIMIENTO PRESTO  
SERVICIOS EL GENERAL  
D. JOSE DE SAN MARTIN.  
HEROE DE ESPAÑA Y DE AMERICA.  
COLOCOSE ESTE RECUERDO CON LA  
PRESENCIA DE S.E. EL EMBAJADOR  
DE LA REPUBLICA ARGENTINA EN ESPAÑA  
DOCTOR JOSE CAMPANO.  
MURCIA 21 NOVIEMBRE MCMLXXIV



# EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

es mejor *conocer* que un efecto tóxico **no existe**  
que *ignorar* que un efecto tóxico **no existe**



## REACH

la protección de la salud humana y del medio ambiente contra los riesgos  
que pueden suponer las sustancias, mezclas y preparados químicos

X X hijo de XII I

Instituto Alfonso X

Universidad de Navarra

1949



1960



1967



1972

CSIC

ISC III / CSIC

UCR

-?-  
CSIC



1972-1975---1977-1979-1981--1996 2002-2015-.....

- 2019 -

UN CSIC IAPC ISCiii CSIC UCP UNC CSIC



## Laboratorio de Mutagénesis Ambiental

## Departamento Contaminación Ambiental

### Grupo de Tratamiento y Reutilización de Residuos Orgánicos – Mutagénesis Ambiental

- ▶ Servicio General de Análisis
- ▶ Servicio de Microscopía Electrónica
- ▶ Servicio de Documentación y Biblioteca

#### Responsable

#### Investigadores:

1. César Plaza de Carlos (Científico Titular (Responsable de Grupo))
2. Eduardo de la Peña de Torres (Científico Titular)
3. José Manuel Fernández Arroyo (Investigador JAE-DOC)
4. María Teresa García González (Directora del ICA)
5. María Esther García López de Sal (Científico Titular)
6. Juan Carlos García-Gil Gallego (Científico titular)
7. Pedro Soler Rovira (Investigador Contratado)
8. M<sup>a</sup> Cristina Zancada Fernández (Científico Titular)
9. Alfredo Polo Sánchez (Profesor de Investigación)

#### Técnicos:

1. Sagrario Fernández Casado
2. **Antonia Martínez López**





# EVALUCION DEL RIESGO DE UN PRODUCTO QUÍMICO

Propiedades Físicos Químicas

Punto de Fusión

Densidad

Estructura Química

Otros datos Físico-Químicos

TOXICIDAD  
para la Salud Humana

Carcinogenicidad

Mutagenicidad

Toxicidad para la Reproducción

Medio Ambiente  
Ecotoxicología

Toxicidad para Peces

Toxicidad para Daphnia

DBO/DQO

**Reglamento nº 1712/2008 sobre clasificación, etiquetado y**  
la quinta adaptación 944/2013 de 2 de octubre, establece los peligros  
para la salud que deben ser considerados

Los Peligros para la Salud son los siguientes:

- 1. Toxicidad aguda**
2. Corrosión o irritación cutáneas
3. Lesiones oculares graves o irritación ocular
4. Sensibilización respiratoria o cutánea
- 5. Mutagenicidad en células germinales**
- 6. Carcinogenicidad**
7. Toxicidad para la reproducción
8. Toxicidad específica en determinados órganos (STOT) exposición única
9. Toxicidad específica en determinados órganos (STOT) exposición repetidas
10. Peligros por aspiración

# ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

## 1. Toxicidad aguda

Procedimientos:

Dosis fija.

Clase tóxica aguda

Arriba y abajo

Objetivo: clasificación por  $D_{L50}$  o efectos evidentes

Al menos dos especies (una roedora y otra no-roedora) y por dos vías de exposición, siendo obligatoria la oral.

Una sola exposición y 14 días de observación.

## 2. Capacidad irritante: dérmica y ocular

## 3. Capacidad sensibilizante

## 4. Capacidad corrosiva: dérmica y ocular

## 5. Toxicidad por exposición repetida o prolongada.

Tipos: Medio plazo (subcrónica) o dosis repetidas: 14, 28 ó 90 días.

Largo plazo (crónica): Mínimo 3 meses, 1-2 años.

Animales: Usualmente: 25 roedores y 6 perros por nivel de dosis.

Lotes: 2-4 niveles, según DL50, con 10 animales de cada sexo por nivel de dosis, como mínimo.

## 6. Carcinogenicidad

## 7. Mutagenicidad

Mutaciones génicas *in vivo*.

Daño cromosómico *in vitro*.

Efectos *in vivo*.

## 8. Toxicidad para la reproducción y el desarrollo:

Estudios multigeneracionales de reproducción: cribado, una generación y dos generaciones.

Estudios de toxicidad para el desarrollo.

Disrupción endocrina.

## 9. Toxicidad para el medio ambiente:

Ensayos en una especie: acuáticas y terrestres.

Ensayos de microcosmos.

Ensayos de macrocosmos.

Estudios de campo.

## 10. Cinética en el organismo y degradación en el medio ambiente:

Toxicocinética.

Degradación.

Bioconcentración.

## 11. Otros: Neurotoxicidad, comportamiento,

## 12. Propiedades fisicoquímicas.

### Objetivos

- B.10: mutagenicidad (método *in vitro* de aberraciones cromosómicas en células de mamífero )
- B.11: mutagenicidad (metodo *in vivo* de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamífero)
- B.12: mutagenicidad en mamíferos por el método de micronucleos
- B.13/14: mutagenicidad - ensayo de mutación reversa utilizando bacteria
- B.15: mutación génica – *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16: recombinación mitótica – *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17: mutagenicidad – ensayo *in vitro* de mutación genética en células de mamífero
- B.18: Daño y reparación del DNA – síntesis no secuencial de DNA . células de mamífero *in vitro*
- B.19: ensayo *in vitro* de intercambio de cromátidas hermanas
- B.20: ensayo del letal recesivo ligado al sexo en *Drosophila melanogaster*
- B.21: ensayo *in vitro* de transformación de células de mamífero
- B.22: ensayo de letal dominante en roedores
- B.23: ensayo de aberraciones cromosómicas en el esperma de mamíferos
- B.24: *spot test* en ratones
- B.25: translocación heredable en ratón
- B.39: ensayo *in vivo* de síntesis desordenada de DNA en células hígado mamífero

En los siguientes apartados se indican cuáles son los ensayos que deben realizarse y, si están incluidos en el Reglamento de métodos de ensayo, su referencia.

1. Ensayos de mutagenicidad hereditaria en células germinales *in vivo* tales como:
  - ensayo de letalidad dominante en roedores (B.22)
  - ensayo de translocación hereditaria en el ratón (B.25)
  
2. Ensayos de mutagenicidad en células somáticas *in vivo* tales como:
  - ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamífero (B.11)
  - ensayo de la mancha en el ratón (B.24)
  - ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero (B.12)
  
3. Ensayos de mutagenicidad o genotoxicidad en células germinales *in vivo* tales como:
  - (a) Ensayos de mutagenicidad:
    - ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de mamífero (B.23)
    - ensayo de micronúcleos en espermátidas
  - (b) Ensayos de genotoxicidad:
    - ensayo de intercambio de cromátidas hermanas en espermatogonias
    - ensayo de síntesis de ADN no programada en células testiculares
  
4. Ensayos de genotoxicidad en células somáticas *in vivo* tales como:
  - ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* (B.39)
  - ensayo de intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea de mamífero
  
5. Ensayos de mutagenicidad *in vitro* tales como:
  - ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos (B.10)
  - ensayo de mutación génica de células de mamífero *in vitro* (B.17)
  - ensayo de mutación inversa en bacterias (B.13/14)

Tabla 5. Ensayos de mutagenicidad y genotoxicidad incluidos en las Monografías del IARC\*

Endpoint <sup>a</sup>	Code	Definition	Endpoint <sup>a</sup>	Code	Definition
<b>NONMAMMALIAN SYSTEMS</b>					
<i>Prokaryotic systems</i>			<i>Lower eukaryotic systems</i>		
D	PRB	Prophage, induction, SOS repair test, DNA strand breaks, cross-links or related damage	D	SSB	<i>Saccharomyces</i> species, DNA strand breaks, cross-links or related damage
D	ECB	<i>Escherichia coli</i> (or <i>E. coli</i> DNA), DNA strand breaks, cross-links or related damage; DNA repair	D	SSD	<i>Saccharomyces</i> species, DNA repair-deficient strains, differential toxicity
D	SAD	<i>Salmonella typhimurium</i> , DNA repair-deficient strains, differential toxicity	D	SZD	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , DNA repair-deficient strains, differential toxicity
D	ECD	<i>Escherichia coli</i> pol A/W3110-P3478, differential toxicity (spot test)	R	SCG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gene conversion
D	ECL	<i>Escherichia coli</i> pol A/W3110-P3478, differential toxicity (liquid suspension test)	R	SCH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , homozygosis by mitotic recombination or gene conversion
D	ERD	<i>Escherichia coli</i> rec strains, differential toxicity	R	SZG	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , gene conversion
D	BSD	<i>Bacillus subtilis</i> rec strains, differential toxicity	R	ANG	<i>Aspergillus nidulans</i> , genetic crossing-over
D	BRD	Other DNA repair-deficient bacteria, differential toxicity	G	SCF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , forward mutation
G	BPF	Bacteriophage, forward mutation	G	SCR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , reverse mutation
G	BPR	Bacteriophage, reverse mutation	G	SGR	<i>Streptomyces griseoflavus</i> , reverse mutation
G	SAF	<i>Salmonella typhimurium</i> , forward mutation	G	STF	<i>Streptomyces coelicolor</i> , forward mutation
G	SA0	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, reverse mutation	G	STR	<i>Streptomyces coelicolor</i> , reverse mutation
G	SA2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA102, reverse mutation	G	SZF	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , forward mutation
G	SA3	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1530, reverse mutation	G	SZR	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , reverse mutation
G	SA4	<i>Salmonella typhimurium</i> TA104, reverse mutation	G	ANF	<i>Aspergillus nidulans</i> , forward mutation
G	SA5	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, reverse mutation	G	ANR	<i>Aspergillus nidulans</i> , reverse mutation
G	SA7	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537, reverse mutation	G	NCF	<i>Neurospora crassa</i> , forward mutation
G	SA8	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538, reverse mutation	G	NCR	<i>Neurospora crassa</i> , reverse mutation
G	SA9	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, reverse mutation	G	PSM	<i>Paramecium</i> species, mutation
G	SAS	<i>Salmonella typhimurium</i> (other miscellaneous strains), reverse mutation	C	PSC	<i>Paramecium</i> species, chromosomal aberrations
G	ECF	<i>Escherichia coli</i> exclusive of strain K12, forward mutation	A	SCN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , aneuploidy
G	ECK	<i>Escherichia coli</i> K12, forward or reverse mutation	A	ANN	<i>Aspergillus nidulans</i> , aneuploidy
G	ECW	<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> , reverse mutation	A	NCN	<i>Neurospora crassa</i> , aneuploidy
G	EC2	<i>Escherichia coli</i> WP2, reverse mutation	<i>Plant systems</i>		
G	ECR	<i>Escherichia coli</i> (other miscellaneous strains), reverse mutation	D	PLU	Plants, unscheduled DNA synthesis
G	BSM	<i>Bacillus subtilis</i> , multigene test	G	ASM	<i>Arabidopsis</i> species, mutation
G	KPF	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , forward mutation	G	HSM	<i>Hordeum</i> species, mutation
G	MAF	<i>Micrococcus aureus</i> , forward mutation	G	TSM	<i>Tradescantia</i> species, mutation
			G	PLM	Plants (other), mutation

<sup>a</sup>Endpoints are grouped within each phylogenetic category as follows: A, aneuploidy; C, chromosomal aberrations; D, DNA damage; F, assays of body fluids; G, gene mutation; H, host-mediated assays; I, inhibition of intercellular communication; M, micronuclei; P, sperm morphology; R, mitotic recombination or gene conversion; S, sister chromatid exchange; and T, cell transformation

## I

(Actos adoptados en aplicación de los Tratados CE/Euratom cuya publicación es obligatoria)

## REGLAMENTOS

## REGLAMENTO (CE) N° 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO

de 16 de diciembre de 2008

sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n° 1907/2006

(Texto pertinente a efectos del EEE)

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea y, en particular, su artículo 95,

Vista la propuesta de la Comisión,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social Europeo <sup>(1)</sup>,

De conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado <sup>(2)</sup>,

Considerando lo siguiente:

- (1) Con el presente Reglamento se pretende garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y del medio ambiente, así como la libre circulación de sustancias químicas, mezclas y ciertos artículos específicos, a la vez que se fomentan la competitividad y la innovación.
- (2) El funcionamiento eficaz del mercado interior de sustancias y mezclas y de los citados artículos solo se puede conseguir si los requisitos que todos ellos deben cumplir no difieren de forma significativa entre Estados miembros.
- (3) Al aproximar las legislaciones sobre los criterios de clasificación y etiquetado de sustancias y mezclas, hay que garantizar un elevado nivel de protección de la salud humana y del medio ambiente, con el fin de lograr un desarrollo sostenible.
- (4) El comercio de sustancias y mezclas no solo es una cuestión del mercado interno, sino también del mercado mundial.

<sup>(1)</sup> DO C 204 de 9.8.2008, p. 47.

<sup>(2)</sup> Dictamen del Parlamento Europeo de 3 de septiembre de 2008 (no publicado aún en el Diario Oficial).

Por ello, las empresas se beneficiarán de la armonización mundial de las reglas de clasificación y etiquetado y de la coherencia entre las destinadas al suministro y el uso, por una parte, y las destinadas al transporte, por otra.

- (5) Para facilitar el comercio mundial, al tiempo que se protege la salud humana y el medio ambiente, se han venido desarrollando cuidadosamente, durante doce años, criterios armonizados de clasificación y etiquetado en la estructura de las Naciones Unidas, lo que ha dado lugar al Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (en lo sucesivo, «SGA»).
- (6) En el presente Reglamento se plasman diversas declaraciones de la Comunidad afirmando su intención de contribuir a la armonización mundial de los criterios de clasificación y etiquetado, no solo a escala de las Naciones Unidas, sino también mediante la incorporación a la legislación comunitaria de los criterios del SGA acordados internacionalmente.
- (7) Las ventajas para las empresas aumentarán conforme más países del mundo vayan incorporando los criterios del SGA a su legislación. La Comunidad debe liderar este proceso para animar a otros países a hacerlo y con el fin de ofrecer una ventaja competitiva a la industria comunitaria.
- (8) Por ello es esencial armonizar las disposiciones y los criterios de clasificación y etiquetado de las sustancias, las mezclas y ciertos artículos específicos en la Comunidad, teniendo en cuenta los criterios de clasificación y las normas de etiquetado del SGA, pero también apoyándose en los 40 años de experiencia en la aplicación de la legislación comunitaria existente sobre productos químicos

## ANEXO

## PARTE B: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD Y OTROS EFECTOS SOBRE LA SALUD

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B .....	143
B.1 bis. TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE DOSIS FIJAS .....	145
B.1 ter. TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA .....	158
B.2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN .....	174
B.3. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA .....	178
B.4. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA .....	182
B.5. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR .....	191
B.6. SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL .....	202
B.7. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) POR VÍA ORAL .....	210
B.8. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) POR INHALACIÓN .....	216
B.9. TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) VÍA CUTÁNEA .....	221
B.10. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS IN VITRO EN MAMÍFEROS ..	225
B.11. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS IN VIVO EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFEROS .....	233
B.12. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO IN VIVO ...	240
B.13/14. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN INVERSA EN BACTERIAS .....	248
B.15. ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS Y DETECCIÓN DE CARCINOGENÉESIS — MUTACIÓN GÉNICA — SACCHAROMYCES CEREVISIAE .....	256
B.16. RECOMBINACIÓN MITÓTICA — SACCHAROMYCES CEREVISIAE .....	259
B.17. MUTAGENICIDAD — ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO IN VITRO ...	262
B.18. LESIÓN Y REPARACIÓN DE DNA — SÍNTESIS DE DNA NO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFEROS IN VITRO .....	271
B.19. ENSAYO IN VITRO DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS .....	275
B.20. ENSAYO DE LETALIDAD RECESIVA LIGADA AL SEXO EN DROSOPHILA MELANOGASTER .....	279
B.21. ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO IN VITRO .....	282
B.22. ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES .....	285
B.23. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIAS DE MAMÍFERO .....	288
B.24. ENSAYO DE LA MANCHA EN EL RATÓN .....	295

## The use of alternatives to testing on animals for the REACH Regulation

One of the main reasons for developing and adopting the REACH regulation was that a large number of chemical substances have been on the European market for many years, with only limited information available on their hazardous properties. It was considered that the gaps in the required information needed to be filled. This would allow industry to make better assessments of the risks posed by production and use of their substances, and to make sure there are adequate risk management measures to protect human health and the environment. To fill these gaps, new studies on chemical substances have to be conducted. Some of these are studies using experimental animals. However, there are several mechanisms in the regulation to avoid unnecessary testing on animals.

The European Chemicals Agency (ECHA) has analysed how companies provide information on the properties of their substances from the submitted registration dossiers. The analysis shows that the alternatives provided by REACH to testing on animals that REACH provides are being used and registrants so far are not carrying out unnecessary testing.

This document is a summary of the first report that the Agency is required to submit every three years to the European Commission, on how companies are using alternatives to testing on animals. Approximately 25 000 registration dossiers submitted by 28 February 2011 have been used as the main source of information for the report. The relevant information in the dossiers has been identified, extracted and analysed using specifically-developed data extraction tools. In addition, the data-sharing mechanisms – where companies making the same chemical share their data with one another – and proposals from companies to perform new tests have also been assessed.

### HIGHER LEVEL OF PROTECTION

The REACH regulation aims for a high level of protection of human health and the environment from the potentially hazardous effects of chemicals. The legislation was the response to the perceived lack of information on the impact of chemicals used in daily life throughout Europe. Now, the regulation imposes a basic responsibility on companies to submit dossiers of information for each and every chemical substance that they manufacture or import at or above one tonne per year. The registrants must be able to demonstrate, using scientifically reliable data, that their chemicals can be used safely.

### INFORMATION REQUIREMENTS

REACH spells out clearly the standard information required, which depends on the volume of a substance that is produced (or imported) in the EU. The volume is used as a way of measuring likely exposure, therefore the higher the tonnage produced or imported the more information that is required on the properties of the substance. Core data is required for all substances. For substances at or above 100 tonnes additional data from testing to identify long-term hazards may be required. The objective of the information requirements is to ensure a high level of protection of human health and the environment.

### AVOIDING UNNECESSARY TESTING ON ANIMALS

Another principle of REACH is that the testing of chemical substances on animals should only be done as a last resort. The regulation provides a number of ways the companies registering substances can achieve this:

- sharing both new and existing data and submitting dossiers jointly with other companies;
- using alternatives to testing on animals to generate the necessary information;
- submitting testing proposals for new studies to investigate the properties for

which information is not yet available for substances at or above 100 tonnes.

### OPTIONS TO FULFIL THE REACH INFORMATION REQUIREMENTS

- Methods to avoid the use of animals**
- Use of information on similar substances (Grouping and Read-across)
  - Information combined together from various sources (Weight of evidence)
  - Studies using cells, tissues or organs (*in vitro*)
  - Computer modelling (QSAR)

### Other justifications for omitting studies

- For example, low exposure considerations

### Animal studies

- Results from existing studies
- Conduct new studies as a last resort to fill data gaps in the core data essential for registration
- Testing proposals for new studies of long-term hazards for example carcinogenicity or reproductive toxicity for substances at or above 100 tonnes

\*ECHA needs to agree before a test can be done

### EXPERIENCE SO FAR

This report is the first that ECHA has provided on the use of alternatives to testing on animals since REACH came into effect. It uses the registration dossiers that have been submitted between 1 June 2008 and 28 February 2011 as its main source of information. The focus of the assessment is on dossiers submitted for substances at or above 100 tonnes per year with the highest data requirements. The companies registering these substances are required to provide the core registration data, any relevant data available from earlier testing on animals

European Chemicals Agency

and to make testing proposals for longer-term hazards, for which data are not yet available.

### DATA SHARING

One core obligation in REACH is that different companies registering the same substance share their data from studies on (vertebrate) animals. This avoids unnecessary testing on animals by allowing all companies needing data for the same substance to use the data available in one of the companies instead of each carrying out their own studies.

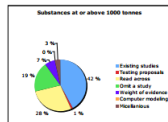
The results of the current analysis demonstrate that the data sharing mechanisms are working and that registrants used them extensively to fulfil their information requirements. Only a limited number of companies appeared to have used the opportunities for submitting data separately.

Another indication of the activity by industry regarding data sharing is when potential registrants make an inquiry to ECHA to find out if their substance has already been registered with a view to using the existing studies. The Agency has processed almost 1 500 inquiries made by potential registrants, and of these, about 50% have led to registration.

### ALTERNATIVES TO NEW ANIMAL TESTING

Registrants made full use of the options available in REACH to use alternatives to carry out new tests on vertebrate animals.

- Registrants mainly used existing animal studies that had already been conducted before REACH
- Predicting the properties of substances by read-across (comparing one substance with another similar one where test data are already available) was the second most common means of fulfilling the information requirements.



REPEATED DOSE TOXICITY – OPTIONS USED TO FULFIL REACH INFORMATION REQUIREMENTS.

### NEW TESTS

The report also provides the number of studies conducted for the purpose of REACH. These include both animal studies and *in vitro* studies that do not use animals but instead cells, tissues or organs to predict the hazardous properties of substances. The current analysis shows that in total 1 451 new *in vitro* studies and 1 849 new animal studies have been conducted since REACH entered into force. The majority of the new animal studies were to provide core data that is mandatory to submit a complete registration dossier. However, 107 studies on animals with a report date of 2009 or after appeared to have been conducted in the absence of testing proposals: The reason for this can be analysed during the evaluation process.

Type of experimental study	Total number*
New experimental studies using cells, tissues or organs	1 451
New experimental studies on animals	1 849
All new experimental studies	3 300

\*Includes category dossiers covering many similar substances and dossiers covering only microdoses, which have greatly reduced information requirements

European Chemicals Agency

### TESTING PROPOSALS

Registrants submitted testing proposals for additional data on vertebrate animals to fulfil their obligation for information on long-term hazards. The Agency needs to agree before such a new study can be conducted. In total so far, 574 registration dossiers included testing proposals:

- amounting to 1 175 individual tests;
- of which 711 were proposals for vertebrate animal studies.

### PROPOSALS TO TEST ON VERTEBRATE ANIMALS

Test	Number of proposals
Repeated dose toxicity (oral)	121
Repeated dose toxicity (dermal)	6
Repeated dose toxicity (inhalation)	27
Genetic toxicity ( <i>in vivo</i> )	25
Carcinogenicity	3
Toxicity to reproduction	231
Developmental toxicity	239
Bioaccumulation: aquatic / sediment	17
Long-term toxicity to fish	38
Long-term toxicity to birds	4
Total	711

The Agency received fewer testing proposals than had been anticipated based on previous estimates from the European Commission or from interested scientists. The reason for this appears to be that registrants have used other available options to fulfil the information requirements before resorting to making a testing proposal for new studies. The most common alternatives to testing used by registrants to fill data gaps were the grouping and read-across approaches; in other words, companies proposed to

conduct one study to cover more than one substance or to use existing data from related substances.

### EVALUATION OF DOSSIERS

Although the evaluation of dossiers is at an early stage, it can be said that the justifications that registrants have provided, for the use of alternatives methods to fulfil information requirements, often fall short of what the legislation requires. As the registration data has to be of sufficient quality for classification and labelling, and for risk assessment it is inevitable that when the dossiers are checked for compliance the Agency will need to ask for some new animal tests to ensure that the information necessary for ensuring the safe use of chemicals is available, unless registrants can improve their scientific justifications.

The Agency will continue using the experience of the evaluation process to help registrants to produce better quality dossiers. This will include awareness raising on alternatives to testing on animals and the promotion of best practice on their use.

### LINKS

This report summary is available in EU 22 languages.

The full report on the Use of Alternative to Test on Animals in REACH 2008 to 2011 can be downloaded here. The report is available only in English. It was published on 30 June 2011.

REACH Regulation EC No 1907/2006 Article 117(3)

• Article 117(3)

© European Chemicals Agency, 2011

### Table of Figures

Figure 1: Schematic of data analysis for individual endpoints .....	21
Figure 2: Acute Toxicity.....	26
Figure 3: Skin irritation <i>in vitro</i> .....	27
Figure 4: Skin irritation <i>in vivo</i> .....	28
Figure 5: Eye irritation <i>in vitro</i> .....	29
Figure 6: Eye irritation <i>in vivo</i> .....	30
Figure 7: Skin sensitisation <i>in vivo</i> .....	31
Figure 8: Repeated dose toxicity – all routes, all study durations.....	33
Figure 9: Genetic toxicity <i>in vitro</i> .....	35
Figure 10: Genetic toxicity <i>in vivo</i> .....	36
Figure 11: Toxicity to reproduction .....	38
Figure 12: Developmental toxicity.....	39
Figure 13: Carcinogenicity.....	40
Figure 14: Bioaccumulation in fish .....	42
Figure 15: Short-term toxicity (fish).....	43
Figure 16: Long-term toxicity (fish).....	44
Figure 17: Long-term toxicity (birds).....	45
Figure 18: Relative proportions of the principal options to fulfil information requirements for human health endpoints for the substances.....	46
Figure 19: Relative proportions of the principal options to fulfil information requirements on environmental endpoints for the substances.....	48

### OPTIONS TO FULFIL THE REACH INFORMATION REQUIREMENTS

#### Methods to avoid the use of animals

- Use of information on similar substances (Grouping and Read-across)
- Information combined together from various sources (Weight of evidence)
- Studies using cells, tissues or organs (*in vitro*)
- Computer modelling (QSAR)

#### Other justifications for omitting studies

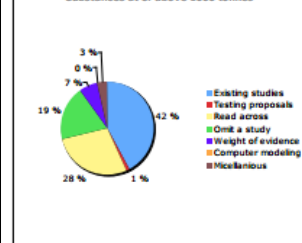
- For example, low exposure considerations

#### Animal studies

- Results from existing studies
- Conduct new studies as a last resort to fill data gaps in the core data essential for registration
- Testing proposals for new studies of long-term hazards for example carcinogenicity or reproductive toxicity for substances at or above 100 tonnes \*

\*ECHA needs to agree before a test can be done

### Substances at or above 1000 tonnes



REPEATED DOSE TOXICITY – OPTIONS USED TO FULFIL REACH INFORMATION REQUIREMENTS.

### PROPOSALS TO TEST ON VERTEBRATE ANIMALS

Test	Number of proposals
Repeated dose toxicity (oral)	121
Repeated dose toxicity (dermal)	6
Repeated dose toxicity (inhalation)	27
Genetic toxicity ( <i>in vivo</i> )	25
Carcinogenicity	3
Toxicity to reproduction	231
Developmental toxicity	239
Bioaccumulation: aquatic / sediment	17
Long-term toxicity to fish	38
Long-term toxicity to birds	4
Total	711



## Clasificación, Etiquetado y Envasado C L P

A partir del 1 junio de 2015 será efectiva la aplicación de las nuevas disposiciones relativas a la **clasificación, etiquetado y envasado** de mezclas del Reglamento CLP. A partir de esa fecha, el reglamento será la única legislación aplicable en este ámbito a las mezclas, si bien ya se aplica a las sustancias químicas desde el 1 de diciembre de 2010. El Reglamento CLP es una legislación de carácter horizontal cuyo objetivo es asegurar un elevado nivel de protección de la salud y el medio ambiente, obligando a los distintos actores a clasificar, etiquetar y envasar sus productos químicos con anterioridad a su comercialización. Las mezclas incluyen una gran diversidad de usos, desde los químicos industriales hasta los productos de consumo, productos biocidas, detergentes, y fitosanitarios, entre otros.

El etiquetado de las mezclas afecta, especialmente, a las pequeñas y medianas empresas que, dadas sus características, podrían no ser conscientes de esta nueva obligación. Otra de las obligaciones impuestas por el Reglamento CLP a los importadores y usuarios intermedios que comercialicen mezclas es la de remitir, en determinados casos, información sobre su composición y clasificación al Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, que proporcionará la correspondiente respuesta sanitaria en caso de urgencia



Hacia un **uso seguro** de las mezclas

Jornada de concienciación a PYMES

**CLP 2015**

Madrid, 15 de octubre de 2014

Salón de Actos Ernest Lluch  
Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

GOBIERNO DE ESPAÑA  
MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD  
MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

CLP 2015: ¡ACTÚA AHORA!

ECHA  
EUROPEAN CHEMICALS AGENCY

The poster features a central graphic of a diamond-shaped hazard symbol containing various icons: a flame, a skull and crossbones, a biohazard symbol, a flame over a circle, a tree and fish, a person with a star on their chest, and a test tube. The background is a collage of chemical-related images like a flask, a beaker, and a plant.

El Reglamento (CE) nº 1272/2008 denominado CLP, acrónimo de **clasificación, etiquetado y envasado**

## NUEVOS PICTOGRAMAS CLP



Contiene gas a presión; peligro de explosión en caso de calentamiento.

Contiene gas refrigerado; puede provocar quemaduras o lesiones criogénicas.



Explosivo inestable.

Explosivo, peligro de explosión en masa.

Explosivo, grave peligro de proyección.

Explosivo, peligro de incendio, de onda expansiva o de proyección.

Peligro de incendio o de proyección.

Peligro de explosión en caso de calentamiento.

Peligro de incendio o explosión en caso de calentamiento.



Puede provocar o agravar un incendio; comburente.

Puede provocar un incendio o una explosión; muy comburente.

Puede agravar un incendio; comburente.



Gas extremadamente inflamable.

Gas inflamable.

Aerosol extremadamente inflamable.

Aerosol inflamable.

Líquido y vapores extremadamente inflamables.

Líquido y vapores muy inflamables.

Líquido y vapores inflamables.

Sólido inflamable.

Peligro de incendio o explosión en caso de calentamiento.

Peligro de incendio en caso de calentamiento.

Se inflama espontáneamente en contacto con el aire.

Se calienta espontáneamente; puede inflamarse.

Se calienta espontáneamente en grandes cantidades; puede inflamarse.

En contacto con el agua desprende gases inflamables que pueden inflamarse espontáneamente.

En contacto con el agua desprende gases inflamables.



Mortal en caso de ingestión.

Mortal en contacto con la piel.

Mortal en caso de inhalación.

Tóxico en caso de ingestión.

Tóxico en contacto con la piel.

Tóxico en caso de inhalación.



Puede irritar las vías respiratorias.

Puede provocar somnolencia o vértigo.

Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Provoca irritación ocular grave.

Provoca irritación cutánea.

Nocivo en caso de ingestión.

Nocivo en contacto con la piel.

Nocivo en caso de inhalación.

Causa daños a la salud pública y al medio ambiente por destruir el ozono en la atmósfera superior.



Puede ser corrosivo para los metales.

Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

Provoca lesiones oculares graves.



Puede ser mortal en caso de ingestión y penetración en las vías respiratorias.

Provoca daños en los órganos.

Puede provocar daños en los órganos.

Provoca daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.

Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.

Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto.

Se sospecha que perjudica la fertilidad o daña al feto.

Puede provocar cáncer.

Se sospecha que provoca cáncer.

Puede provocar defectos genéticos.

Se sospecha que provoca defectos genéticos.

Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.



Muy tóxico para los organismos acuáticos.

Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos duraderos.

Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos duraderos.

## ANTIGUOS SÍMBOLOS DE PELIGRO

Con la aplicación de las nuevas disposiciones de clasificación, etiquetado y envasado, desaparecen los símbolos de peligro conformes al Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo.



## PRINCIPALES DIFERENCIAS

El reglamento CLP introduce una serie de diferencias respecto a la legislación anterior, destacando, entre otras:

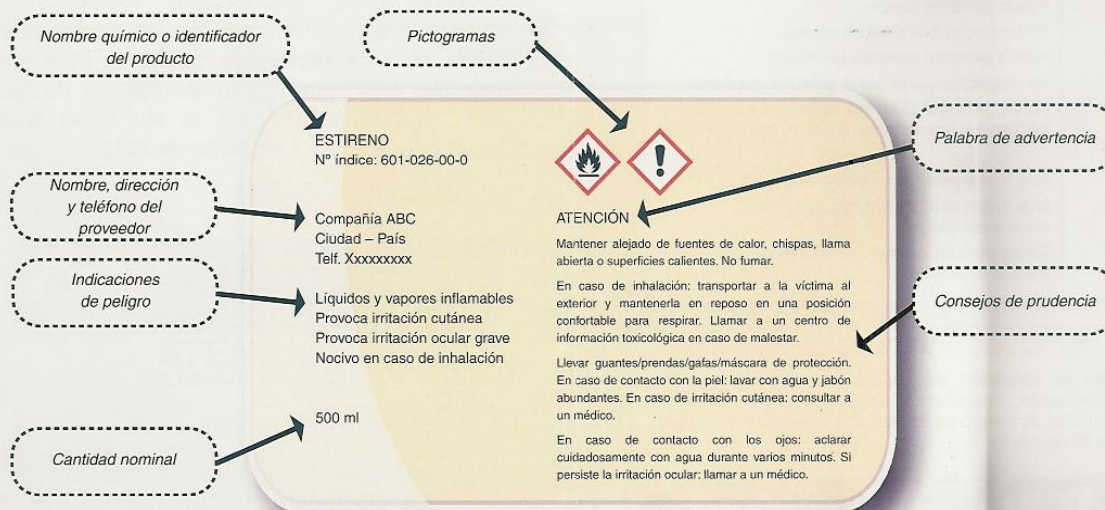
- Nuevos criterios para la clasificación de sustancias y mezclas en nuevas clases y categorías de peligro.
- Sustitución de las frases de riesgo y las frases de prudencia por las nuevas indicaciones de peligro y consejos de prudencia, respectivamente.
- Sustitución de los símbolos de peligro por los nuevos pictogramas.
- Nuevas palabras de advertencia:  
**Atención y Peligro.**

## NUEVAS ETIQUETAS

El reglamento CLP prevé la etiqueta como la herramienta para comunicar información correcta y completa sobre los peligros y el uso seguro de las sustancias y mezclas.

Los elementos de las nuevas etiquetas según CLP son:

- Nombre, dirección, número de teléfono del proveedor o proveedores.
- Cantidad nominal de la sustancia o mezcla.
- Identificadores del producto.
- Pictogramas de peligro.
- Palabras de advertencia.
- Indicaciones de peligro (H).
- Consejos de prudencia (P).
- Información suplementaria (si procede).



Información importante sobre cookies: El Sitio Web del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad utiliza cookies propias para mejorar la navegación. Las cookies utilizadas no contienen ningún tipo de información de carácter personal. Si continua navegando entendemos acepta su uso. Dispone de más información acerca de las cookies y cómo impedir su uso en nuestra Política de cookies. Aceptar

Bienvenidos Benvinguts Ongi etorri Benvidos Benvinguts Welcome Bienvenue



Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad



Buscar  Aceptar

Mapa Web Contactar

- Organización Institucional
- Ciudadanos
- Profesionales
- Biblioteca y Publicaciones
- Portal Estadístico del SNS
- Proyectos normativos
- Servicios Sociales e Igualdad
- Servicios al Ciudadano
- Sede Electrónica

Inicio > Ciudadanos > Salud ambiental y laboral >

## Productos Químicos

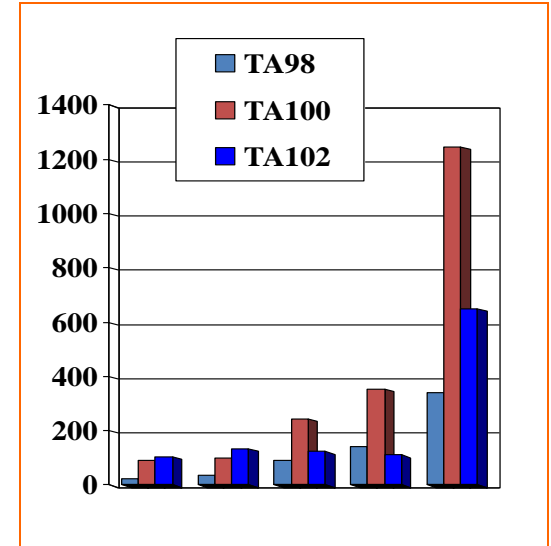
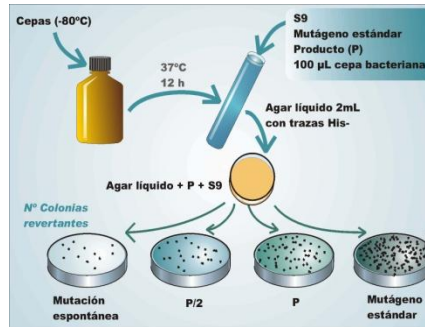
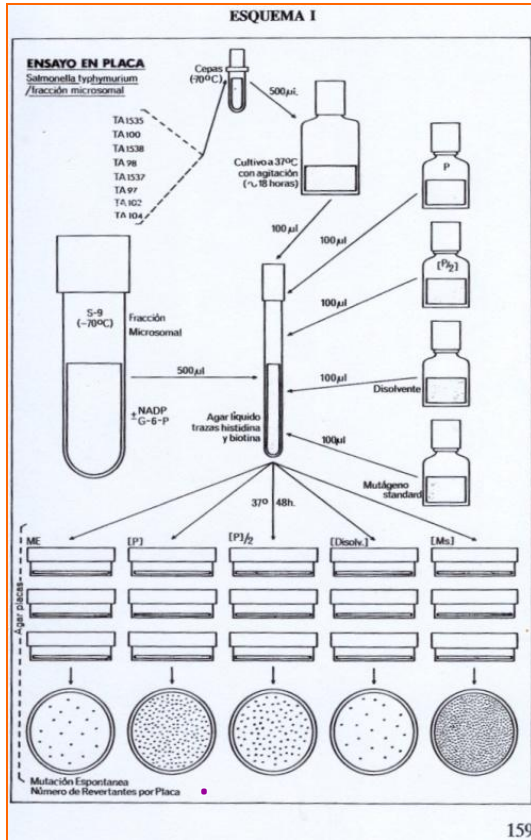
- Protección de la salud
- Enfermedades
- Salud mental
- Accidentes y lesiones
- Violencia y Salud
- Enfermedades raras
- Seguridad del paciente
- Asociaciones de enfermos y familiares
- Salud ambiental y laboral**
- Prestaciones y centros sanitarios
- Información administrativa
- Registro Nacional de Instrucciones Previas
- Posible sustracción de recién nacidos

- Introducción
- Legislación
- Clasificación, Etiquetado y Envasado de Sustancias y Mezclas (Reglamento CLP)
- REACH (Registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias químicas)
- Biocidas
- Red Nacional Toxicovigilancia
- Piscinas
- Programa de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (Sustancias Químicas Industriales) pdf
- Jornada Técnica sobre Clasificación, Etiquetado y Envasado de Sustancias y Mezclas. Presentaciones
- Jornada CLP 2015: Hacia un uso seguro de las mezclas (15 de octubre de 2014).

En cumplimiento de la disposición adicional primera del Real Decreto 1802/2008, de 3 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, con la finalidad de adaptar sus disposiciones al Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento REACH), modificado por el Reglamento (CE) 453/2010 de la Comisión, el proveedor de una sustancia o preparado deberá entregar una copia de la ficha de datos de seguridad al Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, preferiblemente de forma electrónica a través de los mecanismos que la Administración facilite para este fin.

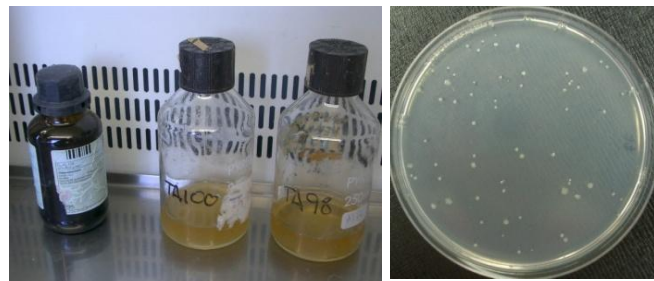
Con el fin de facilitar esta obligación, se ha creado un buzón de correo electrónico (fspqp@msssi.es) donde podrán ser remitidas tales documentos

# Evaluación Genotóxica *Salmonella typhimurium*/ microsoma



## • *Salmonella typhimurium* his-TA98, TA100, TA102

- presencia o ausencia de un sistema de activación metabólica (S9)
- ensayos por triplicado
- control positivo un mutágeno estándar (NQO, MMS)



# Evaluación Genotóxica - *test de Ames* *Salmonella typhimurium*/microsoma

Dr. Bruce N. Ames

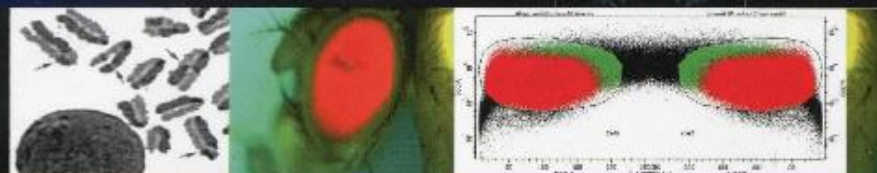


SOT 1996



SOT 2012

L. María Sierra  
Isabel Gaivão *Editors*



# Genotoxicity and DNA Repair

A Practical Approach

## Chapter 1

### Ames Test (Bacterial Reverse Mutation Test): Why, When, and How to Use

Araceli Pillco and Eduardo de la Peña

#### Abstract

The *Salmonella typhimurium*/umutational microsomal assay is the most widely used short term test to identify genetic damage. This is used to assess the mutagenic and antimutagenic potential of compounds and mixtures. This assay uses histidine-dependent strains to detect mutations, e.g., substitutions, additions, or deletions of one or several DNA nucleotides reverting originally changed gene sequence of the tester strains. The addition of a mutagenic chemical agent to a plate of cultured cells results in the growth of mutant colonies; the number of such colonies is an indicator of the mutagenic potency of the agent. The Ames test has many advantages; it is a very versatile assay, its different modifications have been developed to determine mutagenic potencies, and it is recommended by several regulatory agencies. This chapter provides a detailed description of how the standard plate incorporation method should be performed, including the experimental design and interpretation of results.

**Key words** Ames test, Mutagenicity, Toxicity, Spontaneous reversion, *Salmonella*, Standard incorporation plate

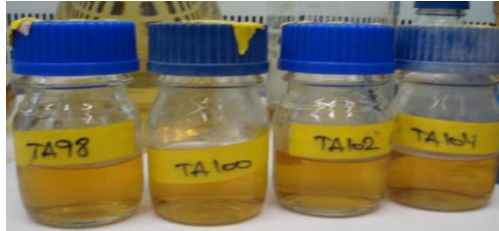
#### 1 Introduction

The bacterial reverse mutation test developed by Bruce Ames and his colleagues [1, 2] is perhaps the most widely used short term bioassay to identify genetic damage that leads to gene mutation. This is a simple tool that can be used to detect the mutagenic and antimutagenic potential of environmental chemicals, environmental mixtures, body fluids, foods, drugs, and physical agents [3–7].

This is a reverse mutation assay that employs histidine dependent *Salmonella* strains with mutations at various genes in their histidine operon, that render them incapable of synthesizing the amino acid histidine. The strains restore their functional capability to synthesize histidine and to grow in the absence of the amino acid required by the parent strain [8]. This event occurs with low frequency. When the *Salmonella* tester strains are grown on a minimal media agar plate containing a trace of histidine, only

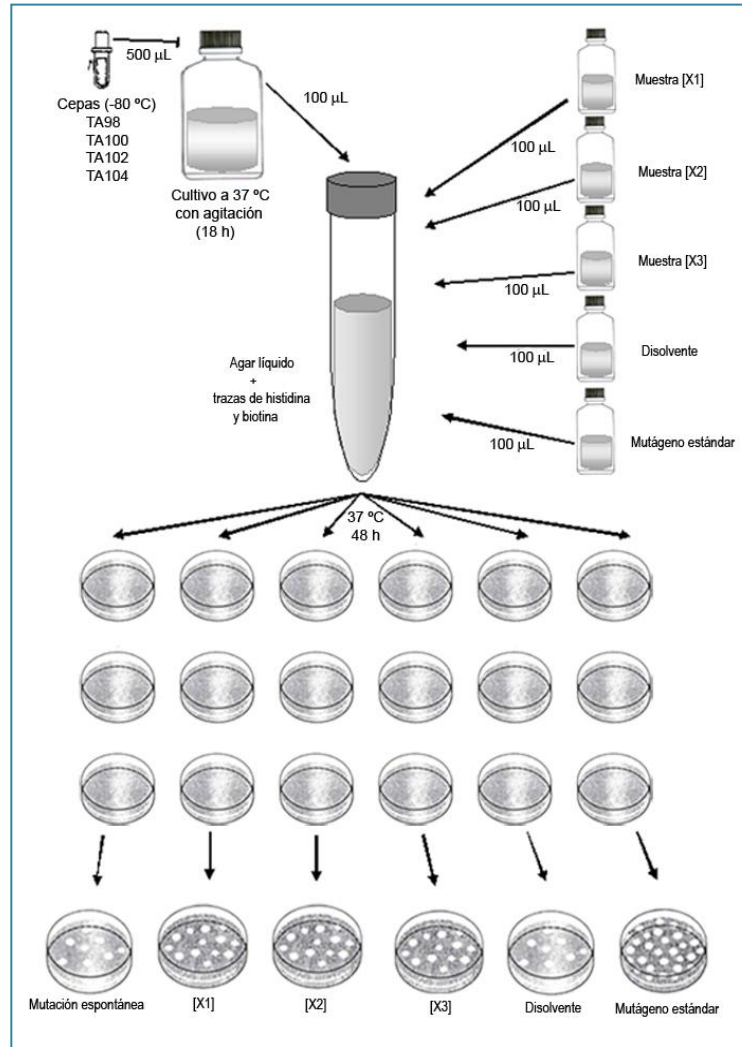
# INCORPORACIÓN EN PLACA ESTÁNDAR

M  
E  
T  
O  
D  
O  
L  
O  
G  
Í  
A

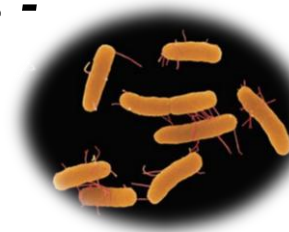


TA98  
TA100  
TA102  
TA104

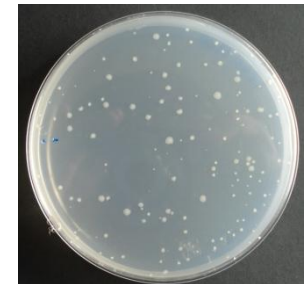
4 Nitroquinolina oxidasa  
Metil metano sulffonato  
Metil metano sulffonato  
Metil Glioxal



His -



Incubación  
48 horas  
37°C





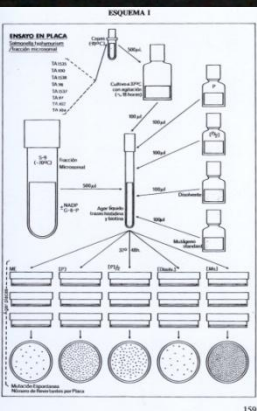


Ratas  
ratones



pruebas  
*in vivo*





# Test de Ames

*Salmonella typhimurium* his-

TA98, TA1537, TA100, TA102, TA104  
Presencia o Ausencia de un sistema de  
activación metabólica (S9)

Ensayos por triplicado

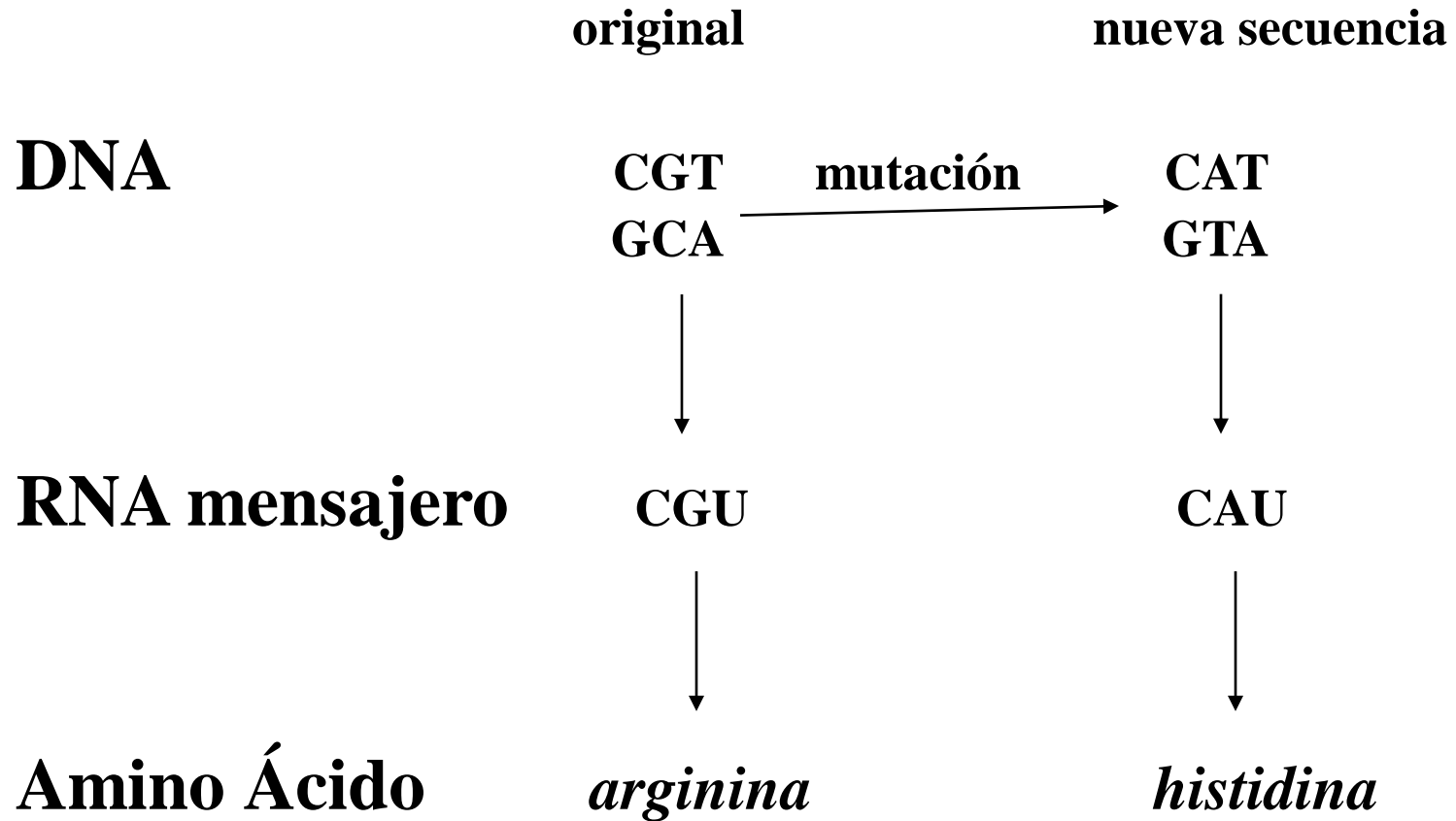
Un compuesto es mutagénico cuando induce 2 veces el número de revertientes respecto al control en 3 concentraciones forma dosis-dependiente

Control positivo un mutágeno estandar (NQO, MMS)





# Consecuencia de la Mutación Puntual





En 2008 la generación de residuos disminuyó un 10%. Este año se prevé que baje más.

## Sin consumo no hay reciclaje

Tras una década de fuerte crecimiento, la recuperación de residuos sufre su primera crisis con la desaceleración económica

# *Ley de Prevención y Control Integrado de la Contaminación - IPPC*

La Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrado de la contaminación

Categorías que se contemplan en el Anejo 1,

- 4. Industrias Químicas
- **5. Gestión de Residuos**
- 9. Industrias agroalimentarias y explotaciones ganaderas
- 9.1 Instalaciones para
- c. Tratamiento y transformación de leche, con una cantidad de leche recibida superior a 200 toneladas por día (valor medio anual)

## *Plan Nacional Integrado de Residuos*

# Descripción de la situación actual

- Incremento de residuos ligado al crecimiento económico
- Déficit de información y de estadísticas
- Mayor sensibilización sobre el problema ambiental de los residuos
- Residuos urbanos de origen domiciliario, legislación compleja y necesidad de articular diferentes modelos de gestión entre todas las administraciones para su cumplimiento
- Nueva normativa para residuos específicos y nuevos sistemas de gestión
- Los programas de I+D+I están empezando a dar resultados
- Se ha mejorado el control, la inspección y la vigilancia
- Diferente grado de desarrollo y aplicación de la normativa entre distintas Administraciones.



# La jerarquía de los residuos

La jerarquía de los residuos

- 1. Prevención**
- 2. Preparación para la Reutilización**
- 3. Reciclaje** incluido el compostaje
- 4. Otro tipo de Valorización**, p.e. la energética
- 5. La Eliminación**

Es una "orden de prioridad" en la legislación y gestión algo más que recomendación pero menos que obligación ...

Se permite apartarse por ciclo de vida

# Valorización

- Uno de los grandes retos de la Directiva de Residuos
- Todos los residuos deben ser sometidos a operaciones de valoración, reutilización, reciclado, energético
- Se establece cuando una operación de incineración es eliminación y cuando es la valorización.
- El anexo II establece una fórmula matemática y se pueden establecer coeficientes de eficiencia
- Operación que sirva para sustituir materiales que se hubieran utilizado o que el residuo sea preparado para esa función o en la economía general

# Fin de la condición residuo

- Dejan de serlo cuando han sido sometidos a una operación de **valorización**, incluido el reciclado y cumplan criterios específicos según las condiciones siguientes:
- Uso para finalidades específicas
- Existe mercado o demanda
- Cumple requisitos técnicos y legislación para productos
- Sin impactos para el medio ambiente

# Valorización:



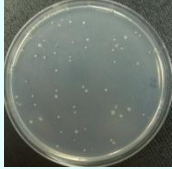
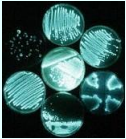
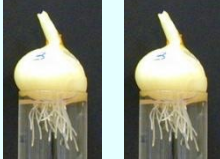

todo procedimiento que permita el **aprovechamiento** de los recursos contenidos en los residuos

**sin poner en peligro la salud humana y**

**sin utilizar métodos que puedan causar perjuicios al medio ambiente.** En todo caso, estarán incluidos en este concepto los procedimientos enumerados en el anexo II.B de la Decisión de la Comisión

# BIOENSAYOS APLICADOS

## Ensayos Específicos

Organismo de ensayo		Parámetro de expresión		
Bacterias	<i>Salmonella typhimurium</i>		Acción mutagénica	+ / -
	<i>Vibrio fischeri</i>		Inhibición luminiscencia	CE <sub>50</sub>
Plantas	<i>Allium cepa</i>		Aberraciones cromosómicas	Índice mitótico 48 h Longitud raíces 72 h
	<i>Lepidum sativum</i>		% Germinación Longitud raíces	Germinación Longitud raíces 6 días



**Agitador por rotación para obtención del lixiviado**

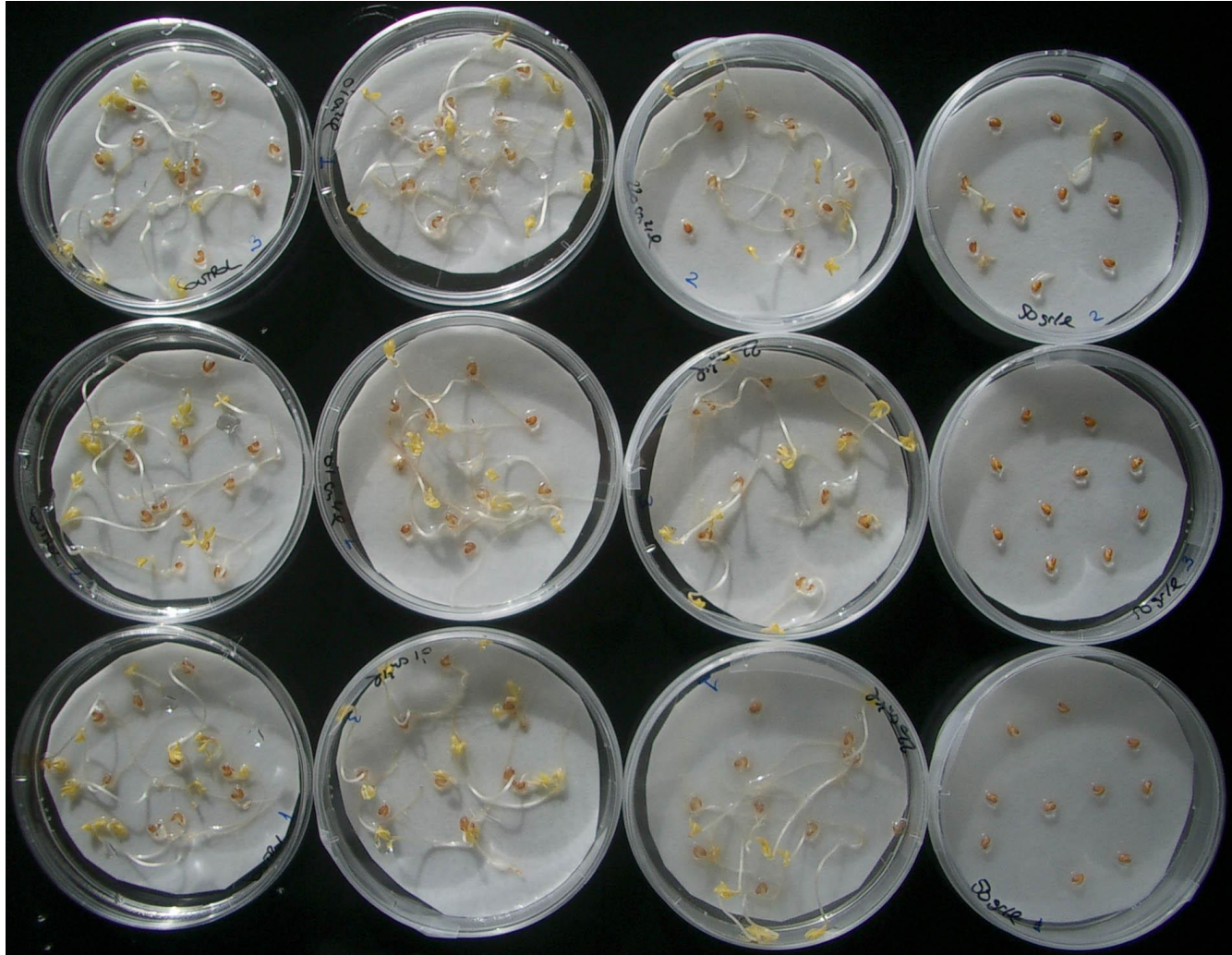
# Respirómetro



Respiración  
en estufa a 20°C  
y con agitación



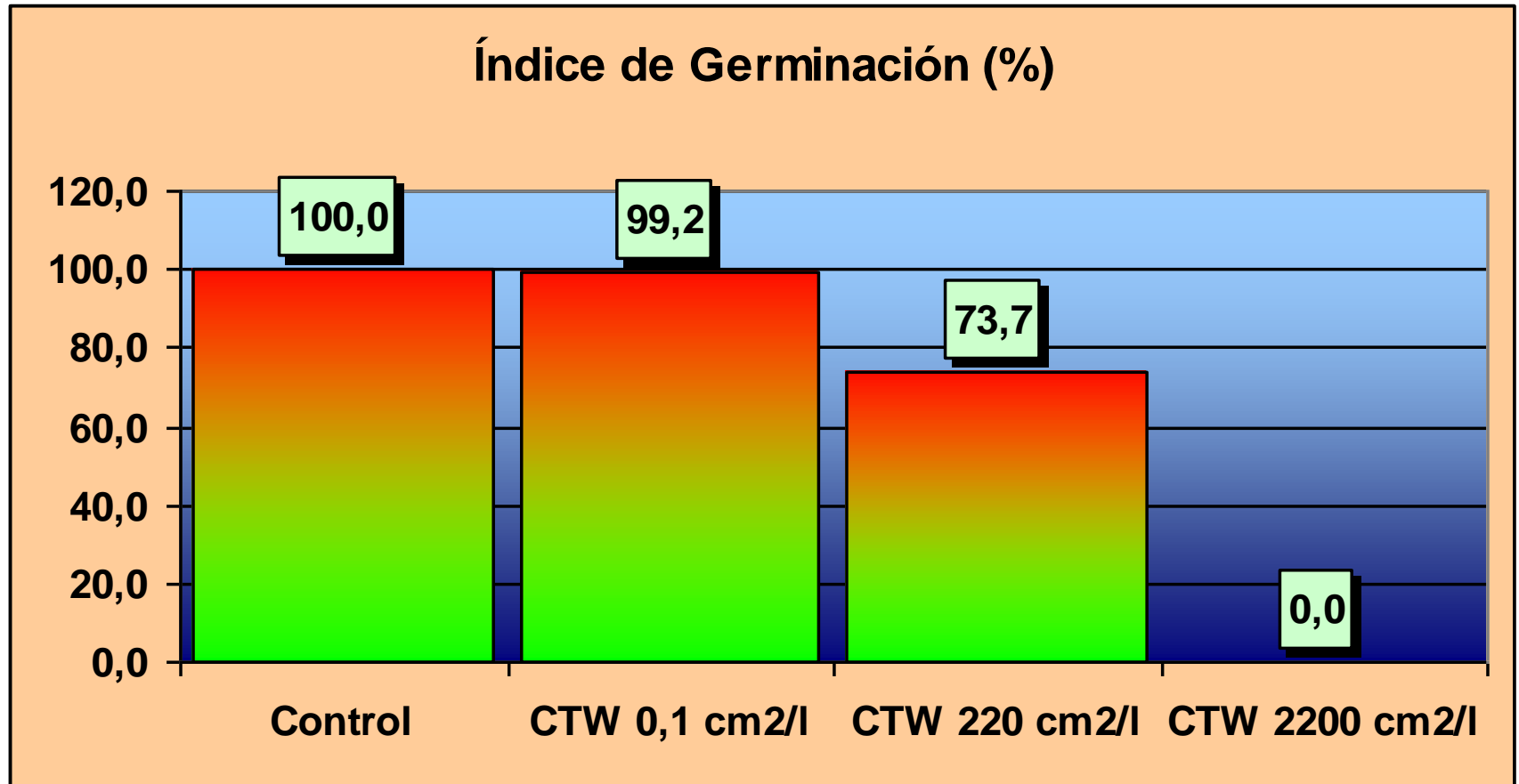
# FITOTOXICIDAD:







# FITOTOXICIDAD:

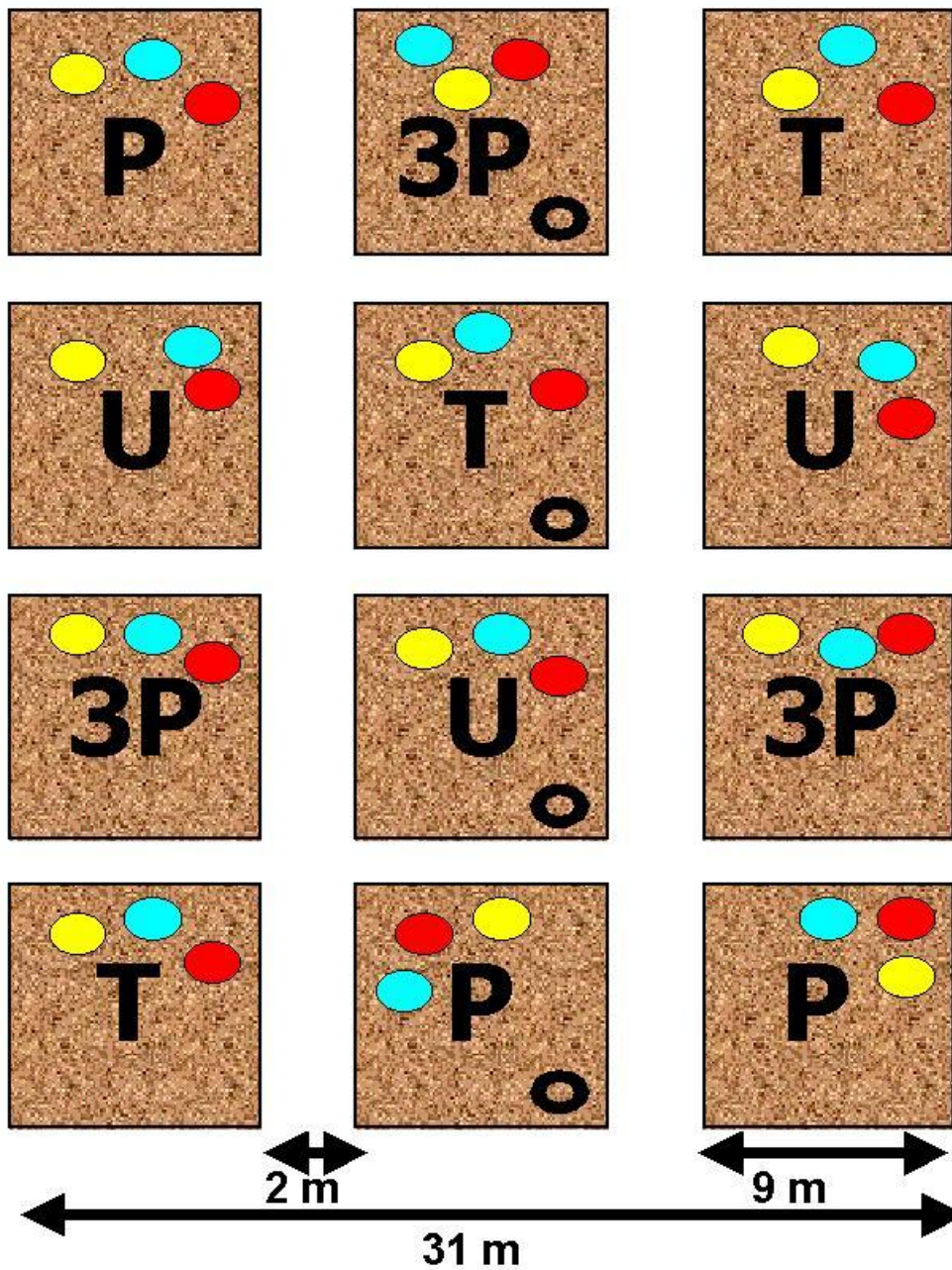






**LA POVEDA**  
***Arganda del Rey***  
***(Madrid)***

53,4 m



2 m

9 m

31 m

### 13 parcelas experimentales:

- T** *Testigo sin fertilizar*
- P1** *Dosis normal de purín*
- P3** *Dosis triple de purín*
- P5** *Dosis quintuple de purín*
- U** *Urea como testigo fertilizado*
-  *Caña de succión a 50 cm*
-  *Caña de succión a 90 cm*
-  *Caña de succión a 140 cm*
-  *Sonda TDR, sonda T<sup>a</sup> y tensiómetros*





## TA98-S9

## TA98+S9

T1	1	2	3	4	Media	SD	1	2	3	4	Media	SD
Control	28	24	13	25	22,5	6,6	30	21	26	25	25,7	3,2
Mutágeno estándar	337	361	212		303,3	80,0	275	284	265		274,7	9,5
Testigo (32.1)	30	22	20		21,0	1,4	30	39	19	30	29,3	10,0
5P50 100%	22	29	27		26,0	3,6	22	20	22		21,3	1,2
5P50 75%	29	15	22		22,0	7,0	27	20	28		25,0	4,4
5P50 50%	28	27	25	19	24,8	4,0	27	29	28	19	28,0	1,0
Metanol	21	20	27		22,7	3,8						

## TA100-S9

## TA100+S9

T1	1	2	3	4	Media	SD	1	2	3	4	Media	SD
Control	132	134	172	149	146,8	18,5	154	177	160	149	163,7	11,9
Mutágeno estándar	3658	4469	1490		3205,7	1540,2	674	566	565		601,7	62,6
Testigo (43.1)	151	150	144		148,3	3,8	140	168	165		157,7	15,4
5P50 100%	168	147	133		149,3	17,6	152	164	168		161,3	8,3
5P50 75%	141	127	160		142,7	16,6	145	168	171		161,3	14,2
5P50 50%	102	133	119		118,0	15,5	175	173	172		173,3	1,5
Metanol	121	137	126		128,0	8,2						

## TA98-S9

## TA98+S9

T3	1	2	3	4	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	16	23	25	25	21,3	4,7	26	16	21	21,0	5,0
Mutágeno estándar	177	93			135,0	59,4	461	320		390,5	99,7
Testigo (11.1)	14	16	26	30	18,7	6,4	33	28	27	29,3	3,2
5P50	26	25	34		28,3	4,9	28	26	27	27,0	1,0
5P140	27	24	33		28,0	4,6	32	18	29	26,3	7,4

## TA100-S9

## TA100+S9

T3	1	2	3	4	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	194	190	160	25	181,3	18,6	156	194	162	170,7	20,4
Mutágeno estándar	4124	3906			4015,0	154,1	978	978		978,0	0,0
Testigo (11.1)	195	183	152	30	176,7	22,2	186	167	178	177,0	9,5
5P50	151	166	179		165,3	14,0	169	158	162	163,0	5,6
5P140	160	227	130		172,3	49,7	143	123	129	131,7	10,3

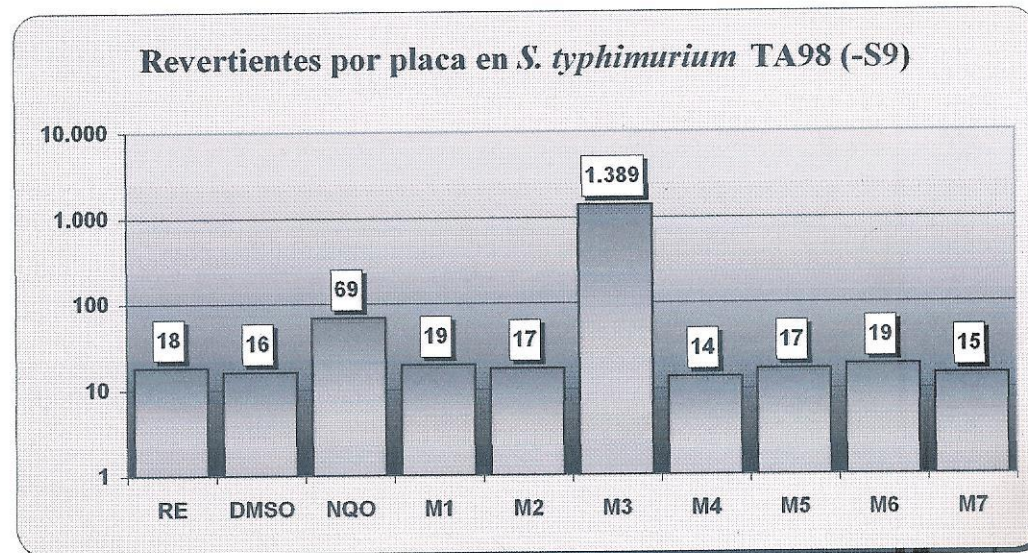
## Test de Mutagenicidad (Ames)

Número de revertientes por placa (R/PP) a las 48 horas en *Salmonella typhimurium*

MUESTRAS		TA98 (-S9)						
		Número de revertientes			Estadísticos		Efecto Mutagénico	
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	Desv. Est.	Índice de mutación	Clasificación
Rev. Espontánea	RE	17	17	20	18	1.73	0.0	NM
Rev. con DMSO	DMSO	15	12	21	16	4.58	-0.1	NM
Rev. con Mutágeno Estándar	NQO	59	95	53	69	22.72	2.8	M1
LT 2002	M1	16	20	22	19	3.06	0.1	NM
LT 2004	M2	11	19	22	17	5.69	0.0	NM
LC 2002	M3	1.282	1.350	1.536	1.389	131.49	76.2	M4
LC 2004	M4	11	14	16	14	2.52	-0.2	NM
Compost 2002	M5	17	13	21	17	4.00	-0.1	M4
Compost 2004	M6	16	21	20	19	2.65	0.1	NM
Papel	M7	16	11	17	15	3.21	-0.2	NM

- M1 - Lodo compostado 1
- M2 - Lodo Compostado 2
- M3 - Lodo deshidratado en maduración
- M4 - Lodo deshidratado muy maduro
- M5 - Compost muy maduro
- M6 - Compost en proceso de maduración
- M7 - Compos neutro

Cuantificación del Efecto Mutagénico		
Abreviatura	Definición	Índice de mutación
NM	No mutagénico	< 2,5
M <sup>1</sup>	Mutagénico muy débil	2,5-3,5
M <sup>2</sup>	Mutagénico débil	3,6-5,5
M <sup>3</sup>	Mutagénico	5,6-10,5
M <sup>4</sup>	Mutagénico alto	> 10,5
T	Efecto tóxico	Colonias pequeñas o ausencia de césped
T <sup>M</sup>	Toxicidad máxima	No existe crecimiento bacteriano





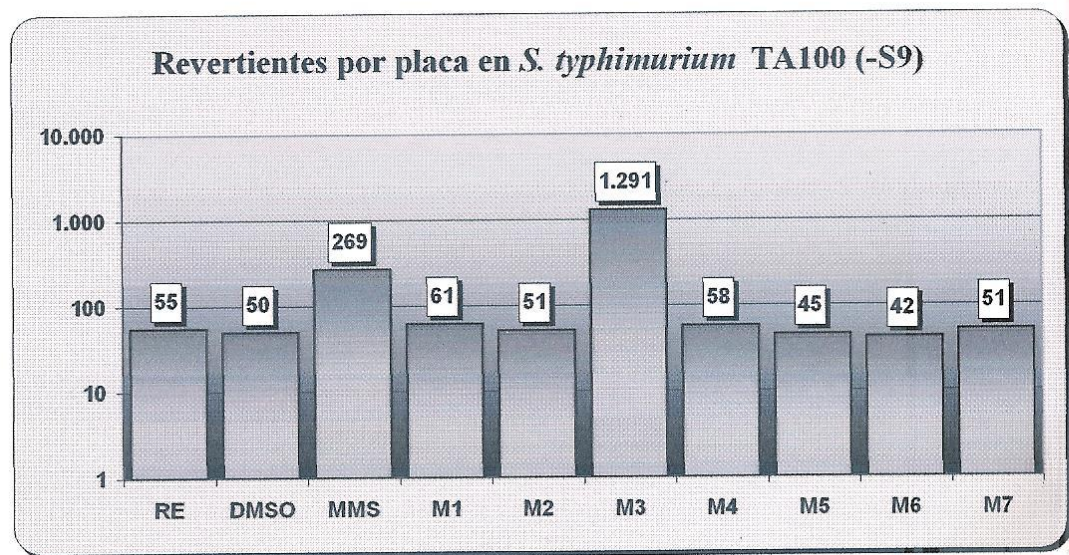
## Test de Mutagenicidad (Ames)

Número de revertientes por placa (R/PP) a las 48 horas en *Salmonella typhimurium*

MUESTRAS		TA100 (-S9)					Efecto Mutagénico	
		Número de revertientes			Estadísticos		Índice de mutación	Clasificación
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	Desv. Est.		
Rev. Espontánea	RE	49	60	56	55	5,57	0,0	NM
Rev. con DMSO	DMSO	41	55	53	50	7,57	-0,1	NM
Rev. con Mutágeno Estándar	MMS	215	277	315	269	50,48	3,9	M2
LT 2002	M1	53	74	56	61	11,36	0,1	NM
LT 2004	M2	50	54	50	51	2,31	-0,1	NM
LC 2002	M3	1.352	1.148	1.374	1.291	124,62	22,5	M4
LC 2004	M4	60	64	49	58	7,77	0,0	NM
Compost 2002	M5	45	42	48	45	3,00	-0,2	NM
Compost 2004	M6	40	39	48	42	4,93	-0,2	NM
Papel	M7	60	36	57	51	13,08	-0,1	NM

- M1 - Lodo compostado 1
- M2 - Lodo Compostado 2
- M3 - Lodo deshidratado en maduración
- M4 - Lodo deshidratado muy maduro
- M5 - Compost muy maduro
- M6 - Compost en proceso de maduración
- M7 - Compos neutro

Cuantificación del Efecto Mutagénico		
Abreviatura	Definición	Índice de mutación
NM	No mutagénico	< 2,5
M <sup>1</sup>	Mutagénico muy débil	2,5-3,5
M <sup>2</sup>	Mutagénico débil	3,6-5,5
M <sup>3</sup>	Mutagénico	5,6-10,5
M <sup>4</sup>	Mutagénico alto	> 10,5
T	Efecto tóxico	Colonias pequeñas o ausencia de césped
T <sup>M</sup>	Toxicidad máxima	No existe crecimiento bacteriano



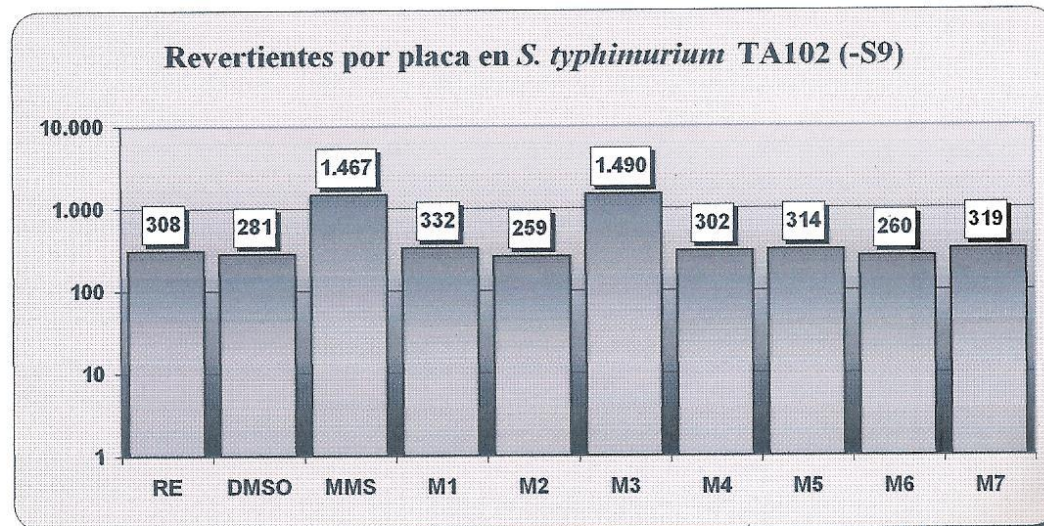
# Test de Mutagenicidad (Ames)

Número de revertientes por placa (R/PP) a las 48 horas en *Salmonella typhimurium*

MUESTRAS		TA102 (-S9)						
		Número de revertientes			Estadísticos		Efecto Mutagénico	
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	Desv. Est.	Índice de mutación	Clasificación
Rev. Espontánea	RE	316	316	292	308	13,86	0,0	NM
Rev. con DMSO	DMSO	281	277	284	281	3,51	-0,1	NM
Rev. con Mutágeno Estándar	MMS	1.448	1.390	1.564	1.467	88,60	3,8	M2
LT 2002	M1	351	321	323	332	16,77	0,1	NM
LT 2004	M2	277	269	232	259	24,01	-0,2	NM
LC 2002	M3	1.668	1.660	1.142	1.490	301,40	3,8	M2
LC 2004	M4	310	332	263	302	35,25	0,0	NM
Compost 2002	M5	330	292	321	314	19,86	0,0	NM
Compost 2004	M6	247	291	243	260	26,63	-0,2	NM
Papel	M7	324	328	306	319	11,72	0,0	NM

- M1 - Lodo compostado 1
- M2 - Lodo Compostado 2
- M3 - Lodo deshidratado en maduración
- M4 - Lodo deshidratado muy maduro
- M5 - Compost muy maduro
- M6 - Compost en proceso de maduración
- M7 - Compos neutro

Cuantificación del Efecto Mutagénico		
Abreviatura	Definición	Índice de mutación
NM	No mutagénico	< 2,5
M <sup>1</sup>	Mutagénico muy débil	2,5-3,5
M <sup>2</sup>	Mutagénico débil	3,6-5,5
M <sup>3</sup>	Mutagénico	5,6-10,5
M <sup>4</sup>	Mutagénico alto	> 10,5
T	Efecto tóxico	Colonias pequeñas o ausencia de césped
T <sup>M</sup>	Toxicidad máxima	No existe crecimiento bacteriano



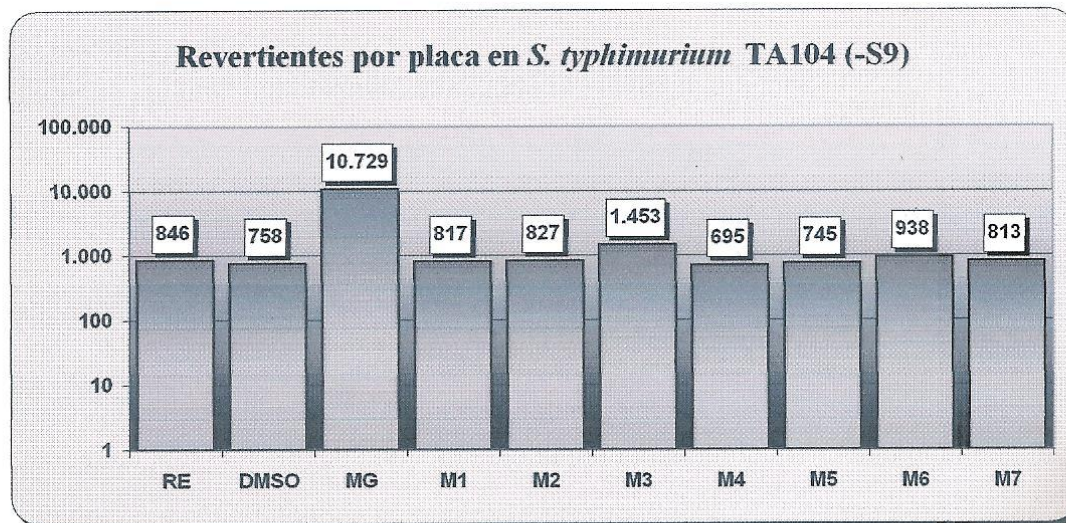
## Test de Mutagenicidad (Ames)

Número de revertientes por placa (R/PP) a las 48 horas en *Salmonella typhimurium*

MUESTRAS		Número de revertientes			Estadísticos		Efecto Mutagénico	
		Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media	Desv. Est.	Índice de mutación	Clasificación
Rev. Espontánea	RE	874	808	856	846	34,12	0,0	NM
Rev. con DMSO	DMSO	720	770	784	758	33,65	-0,1	NM
Rev. con Mutágeno Estándar	MG	10.320	11.025	10.841	10.729	365,68	11,7	M4
LT 2002	M1	812	804	834	817	15,53	0,0	NM
LT 2004	M2	750	854	876	827	67,30	0,0	NM
LC 2002	M3	1.320	1.548	1.492	1.453	118,82	0,7	NM
LC 2004	M4	693	681	710	695	14,57	-0,2	NM
Compost 2002	M5	758	715	762	745	26,06	-0,1	NM
Compost 2004	M6	902	768	1.144	938	190,57	0,1	NM
Papel	M7	842	762	834	813	44,06	0,0	NM

Cuantificación del Efecto Mutagénico		
Abreviatura	Definición	Índice de mutación
NM	No mutagénico	< 2,5
M <sup>1</sup>	Mutagénico muy débil	2,5-3,5
M <sup>2</sup>	Mutagénico débil	3,6-5,5
M <sup>3</sup>	Mutagénico	5,6-10,5
M <sup>4</sup>	Mutagénico alto	> 10,5
T	Efecto tóxico	Colonias pequeñas o ausencia de césped
T <sup>M</sup>	Toxicidad máxima	No existe crecimiento bacteriano

- M1 - Lodo compostado 1
- M2 - Lodo Compostado 2
- M3 - Lodo deshidratado en maduración
- M4 - Lodo deshidratado muy maduro
- M5 - Compost muy maduro
- M6 - Compost en proceso de maduración
- M7 - Compos neutro



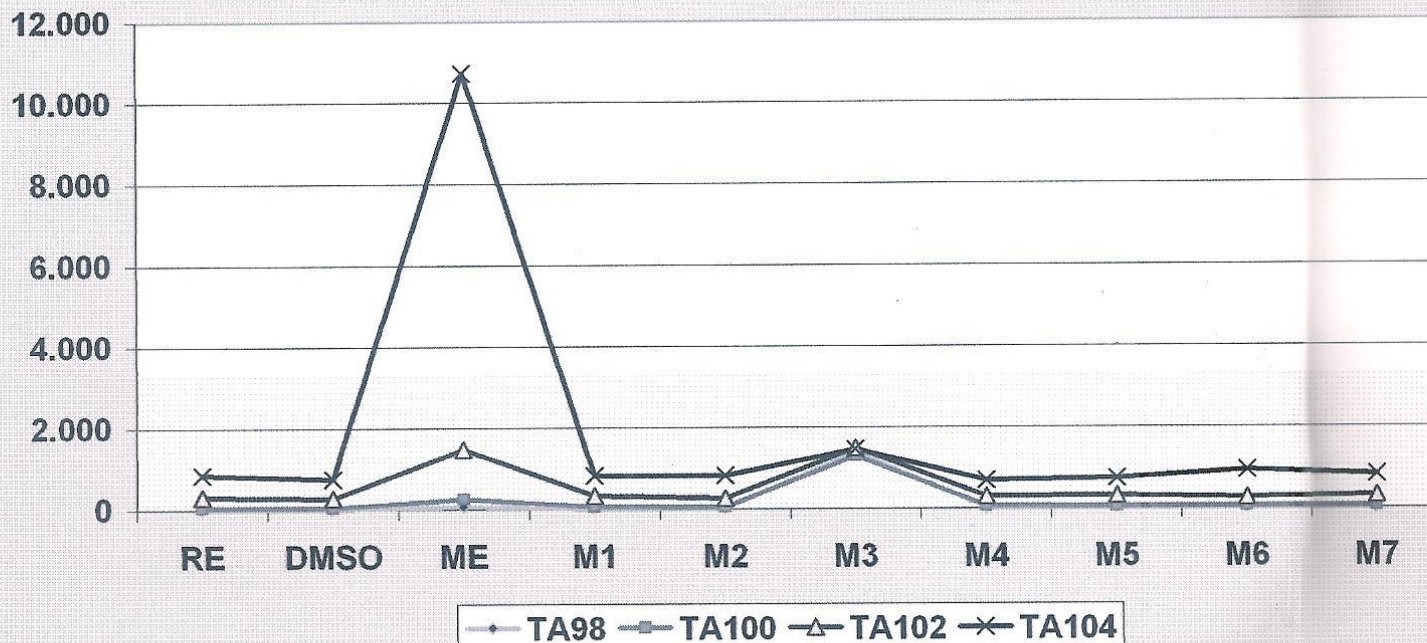
## Test de Mutagenicidad (Ames)

Número de revertientes por placa (R/PP) a las 48 horas en *Salmonella typhimurium*

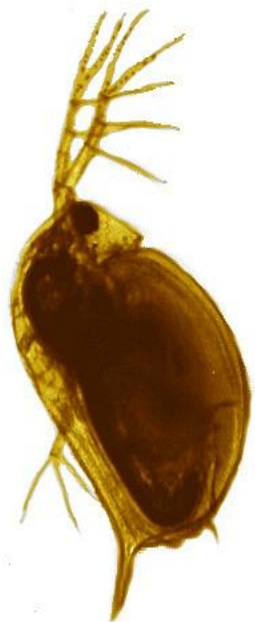
- M1 - Lodo compostado 1
- M2 - Lodo Compostado 2
- M3 - Lodo deshidratado en maduración
- M4 - Lodo deshidratado muy maduro
- M5 - Compost muy maduro
- M6 - Compost en proceso de maduración
- M7 - Compos neutro

	Media Revertientes			
	TA98	TA100	TA102	TA104
RE	18	55	308	846
DMSO	16	50	281	758
ME	69	269	1467	10729
M1	19	61	332	817
M2	17	51	259	827
M3	1.389	1291	1490	1453
M4	14	58	302	695
M5	17	45	314	745
M6	19	42	260	938
M7	15	51	319	813

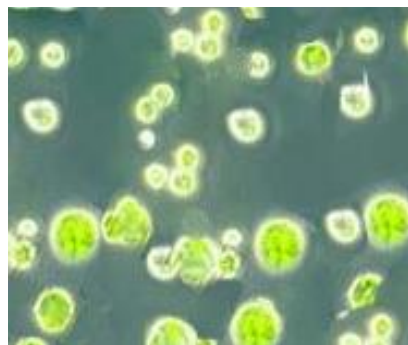
Revertientes por placa en cepas de *S. typhimurium*



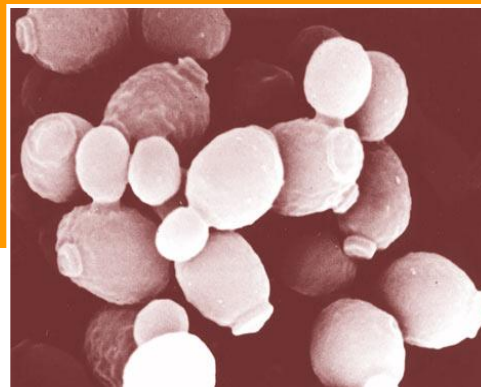
**Toxicidad  
aguda.**



*Daphnia magna*



*Chlorella vulgaris*



**Estrogenicidad:**  
*Saccharomyces cerevisiae*

**Ensayos  
biológicos**

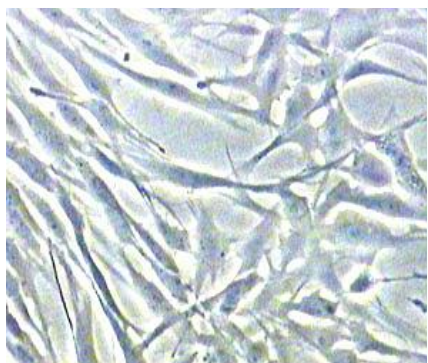


**Toxicidad crónica:**  
**Teratogenia durante  
Desarrollo embrio-larval**  
*Oryzias latipes (Medaka)*



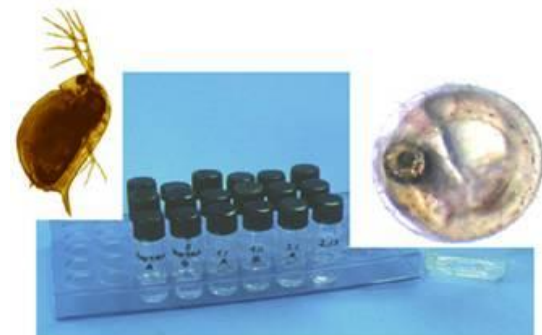
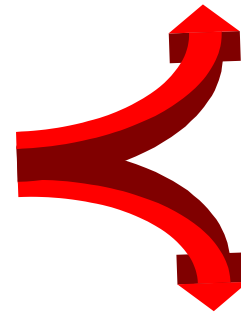
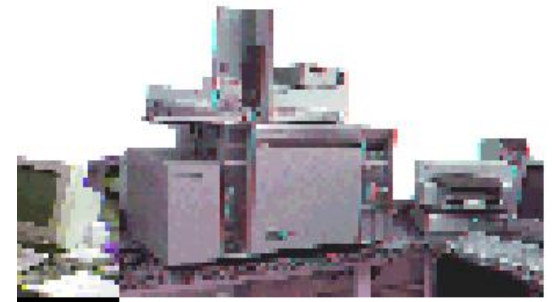
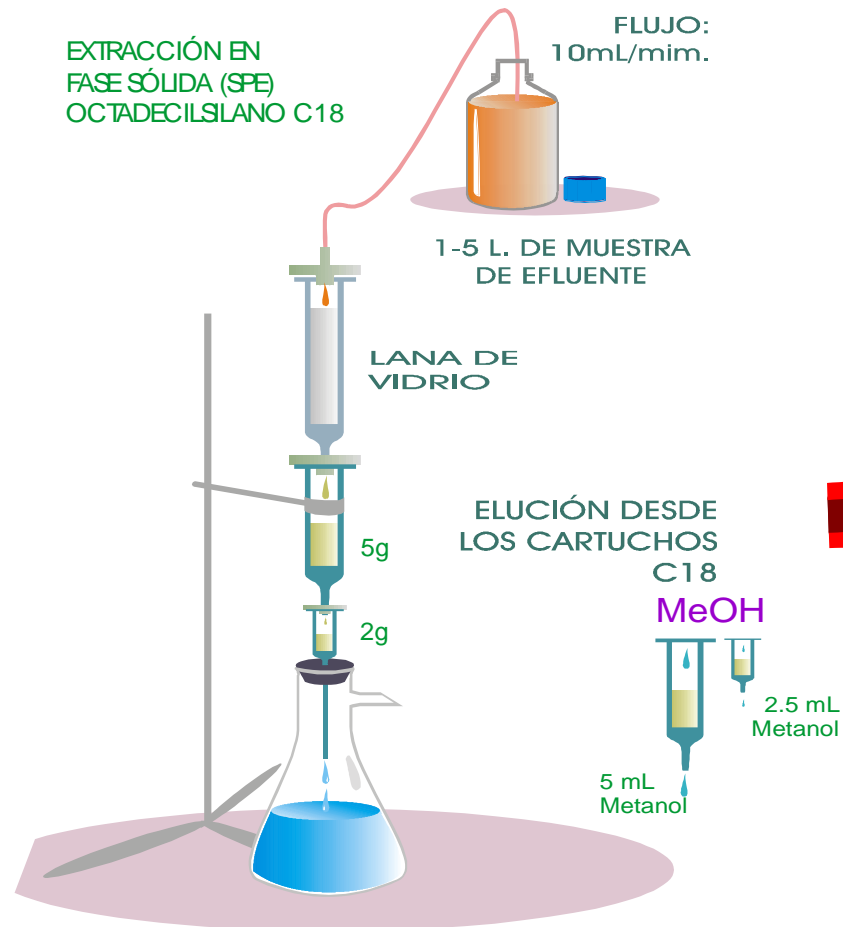
**Mutagenicidad:**  
*Salmonella typhimurium*

**Estrogenicidad  
Teratogenicidad  
Mutagenicidad**



*RTG-2 (Trucha arco iris)*

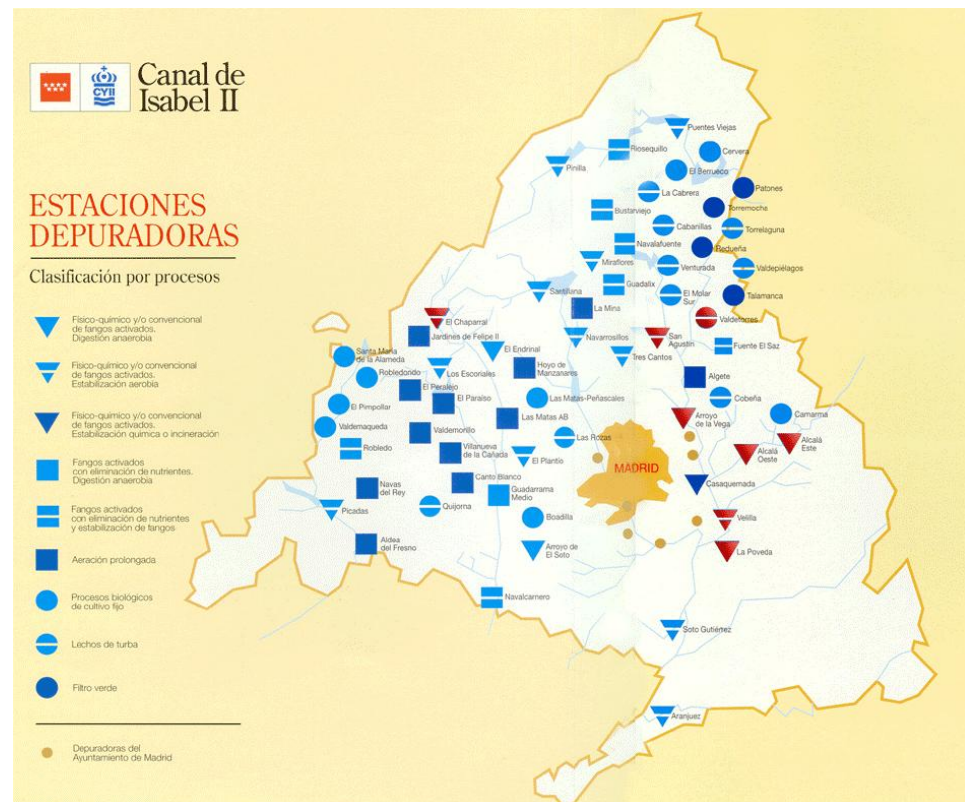
# Evaluación Genotóxica de Sustancias Químicas



# Evaluación Genotóxica de Efluentes de la Comunidad de Madrid

## Depuradoras de la Comunidad de Madrid

- Depuradora D 1
- San Agustín de Guadalix D2
- EL Chaparral D3
- Alcalá Este Urbana D4
- Fuente del Saz D5
- Alcalá Oeste D6
- San Agustín de Guadalix D7
- Velilla D8
- La Poveda D9



## TA100-S9

## TA100+S9

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	69	125	116	92,5	33,2	127	142	122	124,5	3,5
Mutágeno estándar	1709	2063	2150	1929,5	311,8	570	532	605	587,5	24,7
D2A2 50%	94	114	86	90,0	5,7	80	93	108	94,0	19,8
D0A2 100%	65	87	77	71,0	8,5	109	116	92	100,5	12,0
Metanol	96	105	106	101,0	7,1	95	117	112	103,5	12,0

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	132	127	119	125,5	9,2	118	132	129	123,5	7,8
Mutágeno estándar	4135	4083	3379	3757,0	534,6	839	783	781	810,0	41,0
D3A2 50%	118	92	116	117,0	1,4	106	112	106	106,0	0,0
D3A2 25%	105	100	104	104,5	0,7	113	105	103	108,0	7,1
Metanol	106	109	111	108,5	3,5	106	112	106	106,0	0,0

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	121	123	162	141,5	29,0	186	177	167	176,5	13,4
Mutágeno estándar	2989	3356	3476	3232,5	344,4	1631	875	880	1255,5	531,0
D7A2 50%	150	153	172	161,0	15,6	181	179	204	192,5	16,3
D7A2 25%	154	164	154	154,0	0,0	168	159	159	163,5	6,4
Metanol	151	172	162	156,5	7,8	174	179	135	154,5	27,6

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	18	26	25	21,5	4,9	20	23	27	23,5	4,9
Mutágeno estándar	259	82	181	220,0	55,2	333	340	360	346,5	19,1
D5A2 50%	22	22	20	21,0	1,4	30	30	26	28,0	2,8
D5A2 25%	27	21	23	25,0	2,8	30	24		27,0	4,2
Metanol	23	25	29	26,0	4,2	17	17	21	19,0	2,8



## TA98-S9

## TA98+S9

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	25	23	22	23,5	2,1	17	25	21	19,0	2,8
Mutágeno estándar	385	319	348	356,5	12,0	867	512	481	674,0	272,9
D2A2 50%	18	17	18	18,0	0,0	20	22	28	24,0	5,7
D0A2 100%	20	19	25	22,5	3,5	16			16,0	0,0
Metanol	17	25	15	16,0	1,4	21	27	22	21,5	0,7

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control						25	29	28	26,5	2,1
Mutágeno estándar	138			138,0		214	200	189	201,5	17,7
D3A2 50%	23	22	16	19,5	4,9	23	20	19	21,0	2,8
D3A2 25%	17	15	13	15,0	2,8	26	21	28	23,5	3,5
Metanol	12			12,0		18	28	23	20,5	3,5

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	36	29	35	35,5	0,7	38	43	39	38,5	0,7
Mutágeno estándar	437	398	407	422,0	21,2	1024	979	773	898,5	177,5
D7A2 50%	22	25	34	28,0	8,5	28	34	37	32,5	6,4
D7A2 25%	20	20	27	23,5	4,9	33	39	31	32,0	1,4
Metanol	29	27	27	28,0	1,4	31	35	35	33,0	2,8

	1	2	3	Media	SD	1	2	3	Media	SD
Control	134	124	125	129,5	6,4	135	103	130	132,5	3,5
Mutágeno estándar	2780	3350	2991	2885,5	149,2	513	404	424	468,5	62,9
D5A2 50%	78	105	104	90,0	19,8	111	98	124	117,5	9,2
D5A2 25%	108	85	95	101,5	9,2	115	108	107	111,0	5,7
Metanol	97	102	116	106,5	13,4	111	87	91	101,0	14,1



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Science of the Total Environment 328 (2004) 69–81

Science of the  
Total Environment  
An International Journal for Scientific Research into the  
Environment and its Relationship with Humankind

[www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents

Sonia Aguayo<sup>a</sup>, M. Jesús Muñoz<sup>b</sup>, Ana de la Torre<sup>b</sup>, Jaime Roset<sup>a</sup>, Eduardo de la Peña<sup>c</sup>,  
Matilde Carballo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Animal Health Department, U.C.M. Ctra. Coruña s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Animal Health Research Center, CISA-INIA, Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain

<sup>c</sup>Environmental Science Center, CCMA-CSIC, C/Serrano 115 dpto. 28006 Madrid, Spain

Received 19 August 2003; received in revised form 10 November 2003; accepted 23 February 2004

### Abstract

An integrated approach combining chemistry and biological methods was conducted to assess the toxicity of seven sewage treatment plant effluents. Solid phase concentration procedures were applied to facilitate the study of organic micro pollutants. A chemical analysis was performed by GC/MS. Organic fraction toxicity was determined by using bioassays such as *Daphnia magna* and *Chlorella vulgaris* tests and sub-lethal effects were also evaluated by using *Salmonella typhimurium* Test (mutagenicity), recombinant yeast screen (estrogenicity), and *Oryzias latipes* embryonal larval test. More than 49 compounds were detected in the organic fraction due to the various inputs of each effluents. The most frequently detected compounds in the effluents were bisphenol A (BPA), octylphenol (OP), 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (DEHP) and 1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(methylpropyl) ester (DBP). Biological assays showed toxicity effects on *D. magna* tests in all samples, whereas toxicity on *C. vulgaris* or *S. typhimurium* tests were not observed. Estrogenicity and teratogenicity were observed in several samples. The cause-effect relationship could not be established given the high chemical complexity of the effluents and the lack of information available on 70% of the detected compounds subsequent to reviewing various data bases. Nevertheless, due to the high chemical variability revealed by STP effluents, bioassay sets may provide a very useful amount of information for detecting potential toxicity risks.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** STP effluents; Organic pollutants; Solid phase concentration; GC/MS; Sublethal effects; Toxicity

Table 2

Organic compounds identified by GC/MS in the seven effluents and their percentage of apparition. It is also shown the type of effects on aquatic organisms referenced according to the consulted data base (Toxicity, Endocrine Disruption (ED), Carcinogenicity (C), Mutagenicity (M) and Teratogenicity (Ter)). Due to the range of toxicity presented, compounds are considered as Very Toxic (VT), Toxic (T) and Harmful (H) and Not Toxic (NT), when the values of toxicity ranged from: 0–1 mg/l, 1–10 mg/l, 10–100 mg/l, and > 100 mg/l, respectively (CD/67/548/EEC)

Compounds	CAS	% Apparition	Effects
Bisphenol A (BPA)	80-05-7	100	T/ED
Octylphenol (OP)	140-66-9	100	VT/ED
Di-isobutyl-phthalate (DIBP)	84-69-5	86	T/ED
N,N-Dimethyl-benzenamine	121-69-7	86	T/C
Di-ethylhexyl-phthalate (DEHP)	117-81-7	86	VT/C/ED/M
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	128-39-2	57	T/C
Di-ethyl phthalate (DEP)	84-66-2	57	H/M
3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-(5)-pyridine.	54-11-5	43	VT
17 β Estradiol (E2)	50-28-2	43	ED
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	1120-25-8	43	–
Hexadecanoic acid, methyl ester	112-39-0	43	–
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	128-37-0	29	–
Phenol, 4-(2,2,3,3-tetramethylbutyl)	54932-78-4	29	VT
Estra, 1,3,5(10)-trien-17-one, 3-methoxy-	1624-62-0	29	–
Phenol, (1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	25013-16-5	29	C
Phosphoric acid, tributyl ester	126-73-8	29	T
Pyridine, 2,3-dimethyl-	583-61-9	29	–
Ethynil estradiol (EE2)	57-63-6	29	ED/M
7-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzothipyan	86778-101	14	–
Benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-methyl-	6443-69-2	14	T
Galaxolide	–	14	–
1,2,7,8,8a,9,10a Octahydro 2,2,7,7-tetramethylphenanthrene	81478-79-7	14	–
1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro-	603-11-2	14	–
Di-butyl-phthalate (DBP)	84-74-2	14	T/ED/Ter
1-Butanamine, N,N-dibutyl-	102-82-9	14	T
2-Propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)-	20324-32-7	14	–
3-Eicosene, (E)-	74685-33-9	14	–
7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	56875-67-3	14	–
Benzenamine, N,N-diethyl-	91-66-7	14	T
1,3-dimethyl-Benzene	108-38-3	14	T
Benzene, trimethyl(1-methylethyl)-	33991-29-6	14	–
Benzothiazole, 2-(methylthio)-	615-22-5	14	–
Cyclohexanone, 4-(1,1-dimethylethyl)-	98-53-3	14	–
Diazinon	333-41-5	14	VT/Ter
Diphosphoric acid, tetraethyl ester	107-49-3	14	VT
Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3-hydroxy-1-methyl	4011-48-7	14	–
Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3-methoxy-, (9b,13a)-	58072-52-9	14	–
Ethanol, 2-phenoxy-	122-99-6	14	H
Ethanone, 1,1'-(1,4-phenylene) bis	1009-61-6	14	–
Ethanone, 1-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-	54549-72-3	14	–
N-Formyl-2-(2,5-dimethylphenyl)-piperidine	80574-60-3	14	–
Octadecene, (E)-	7206-21-5	14	–
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	5129-60-2	14	–
Phenol	108-95-2	14	T/M
Phenol, 3-(1-methylethyl)	618-45-1	14	–
Triethyl phosphate	78-40-0	14	–
Pyridine, 2,3,5-trimethyl-	695-98-7	14	–
Pyridine, 2,3,6-trimethyl-	1462-84-6	14	–
Tertio butyl hydroxy anisole	121-00-6	14	–

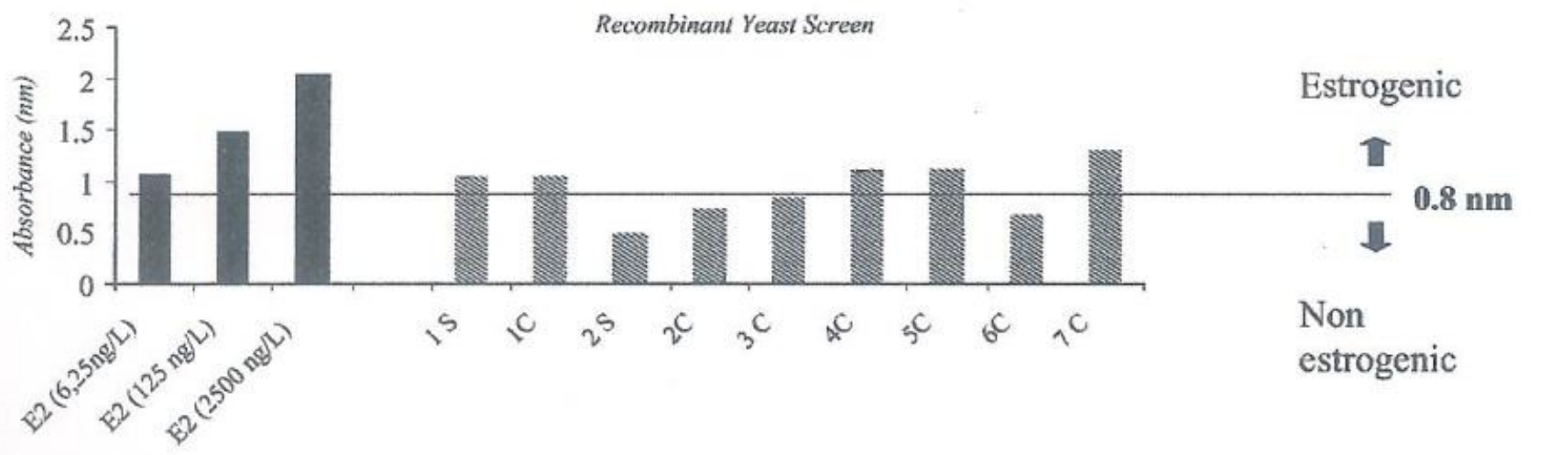
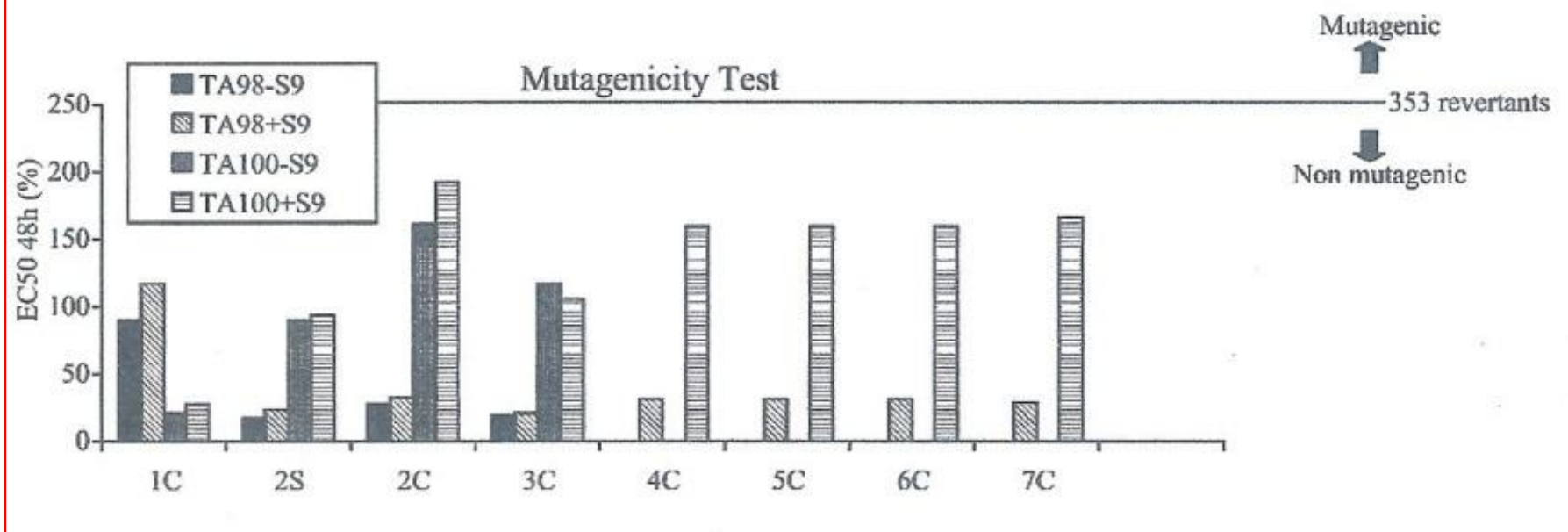


Fig. 2. Results of the different bioassays in the original STP effluents.

# Evaluación Genotóxica de los contaminantes de los Efluentes de Depuradoras de Gran Canaria, Islas Canaria (Archipiélago Canario)

El estudio que aquí se presenta se engloba dentro de un proyecto de valoración sanitaria de varias especies de cetáceos residentes en el archipiélago canario y los objetivos de dicho proyecto son los siguientes:

- estudiar el estatus de salud de estos mamíferos marinos, cuyo hábitat está influenciado por actividades humanas.
- conocer las patologías y causas de las muertes.
- conocer la contribución de las fuentes de contaminación en las patologías.
- valorar la exposición y los efectos potenciales.
- valorar los depósitos de contaminantes en tejidos.
- relacionar patologías reproductoras con compuestos químicos.
- establecer un banco de tejidos para estudios retrospectivos y prospectivos.

# Evaluación Genotóxica de Efluentes de Gran Canaria (Las Palmas)

Muestra / Origen

C1 / Efluente Industrial: Arinaga Fase III y II

C2 / Efluente Mixto: Arinaga

C3 / Efluente Urbano: Ingenio y Aguimes

C4 / Efluente de Depuradora: EDAR Sureste

C5 / Efluente de Depuradora: EDAR Barranco Seco

C6 / Rechazo de EDAR: Barranco Seco

C7 / Balsa de Riego: La Aldea



# Evaluación Genotóxica de Efluentes de Depuradoras

	TA98	TA100
C1 (100%)	29	100
C1 (50%)	30	99
C1 (25%)	28	98
C2 (100%)	35	48
C2 (50%)	30	84
C3 (100%)	13	42
C3 (50%)	17	60
C4 (100%)	29	58
C4 (50%)	15	57
C5 (100%)	19	81
C5 (50%)	11	74
C6 (100%)	30	91
C6 (50%)	23	93
C7 (100%)	29	88
C7 (50%)	24	91

	TA98	TA100
R.E.	25	82
R.S.	18	87
R.MeOH	18	81
R.M.	148	1.299

	TA98	TA100
R.E.	20	93
R.S.	18	91
R.MeOH	24	106
R.M.	128	1.191

	TA98	TA100
C6 (100%)	26	93
C6 (75%)	21	93
C6 (50%)	21	88

R.E.: Reversión Espontánea

R.S.: Reversión con DMSO

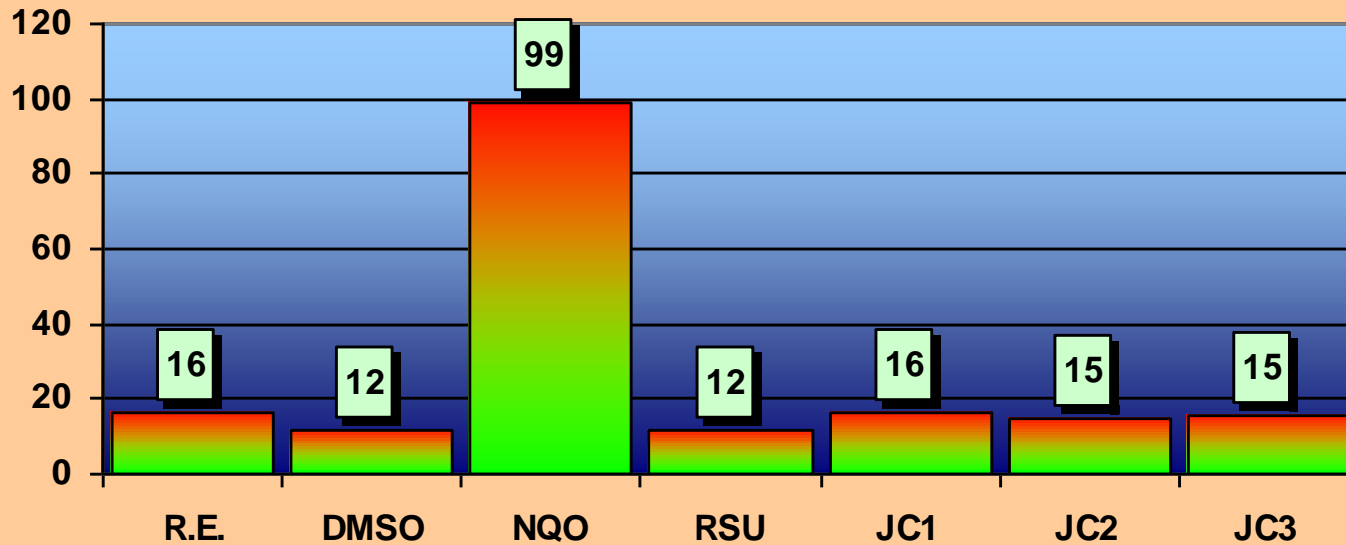
R.MeOH: Reversión con Metanol

R.M.: Reversión con Mutágeno estándar

TA98: 4-NQO (Óxido de 4 Nitroquinolina)

TA100: MMS (Metil Metano Sulfonato)

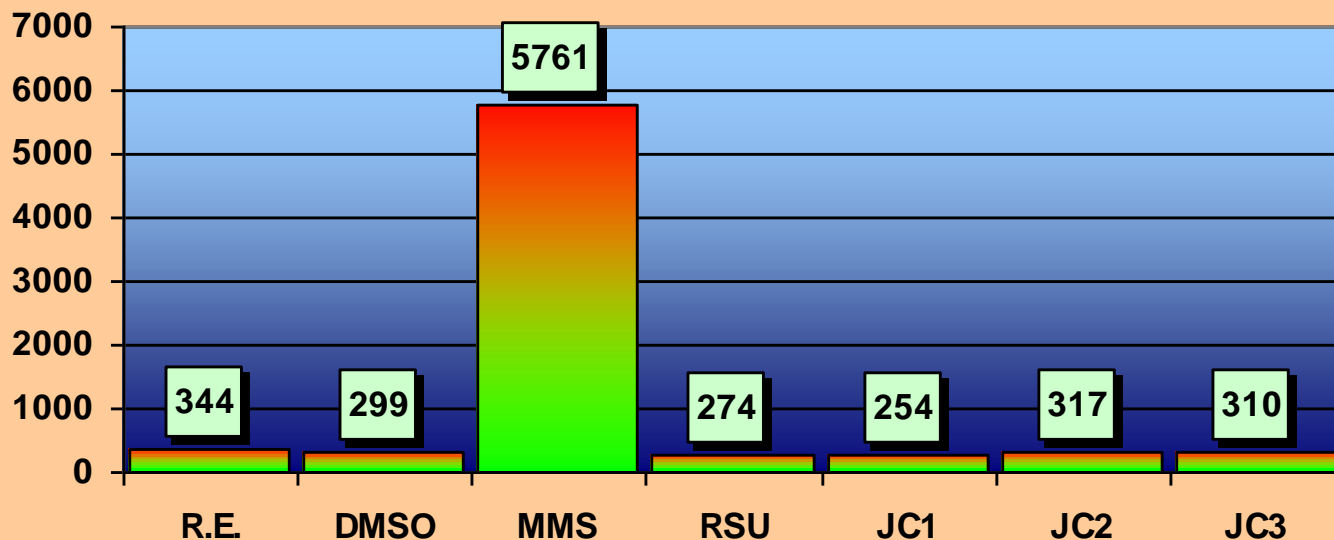
## Nº Revertientes en *Salmonella typhimurium* TA98



	TA98		
	Reversión	Índice	Clasificación
R.E.	16	1	NM
DMSO	12	0,71	NM
NQO	99	6,06	M <sup>2</sup>
RSU	12	0,73	NM
JC1	16	1,00	NM
JC2	15	0,92	NM
JC3	15	0,94	NM

CEPA: TA98				
TA98				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
R.E.	13	16	20	16
DMSO	8	15	12	12
NQO	101	128	68	99
TA98				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
RSU	11	9	16	12
JC1	12	17	20	16
JC2	14	20	11	15
JC3	17	14	15	15

## Nº Revertientes en *Salmonella typhimurium* TA102

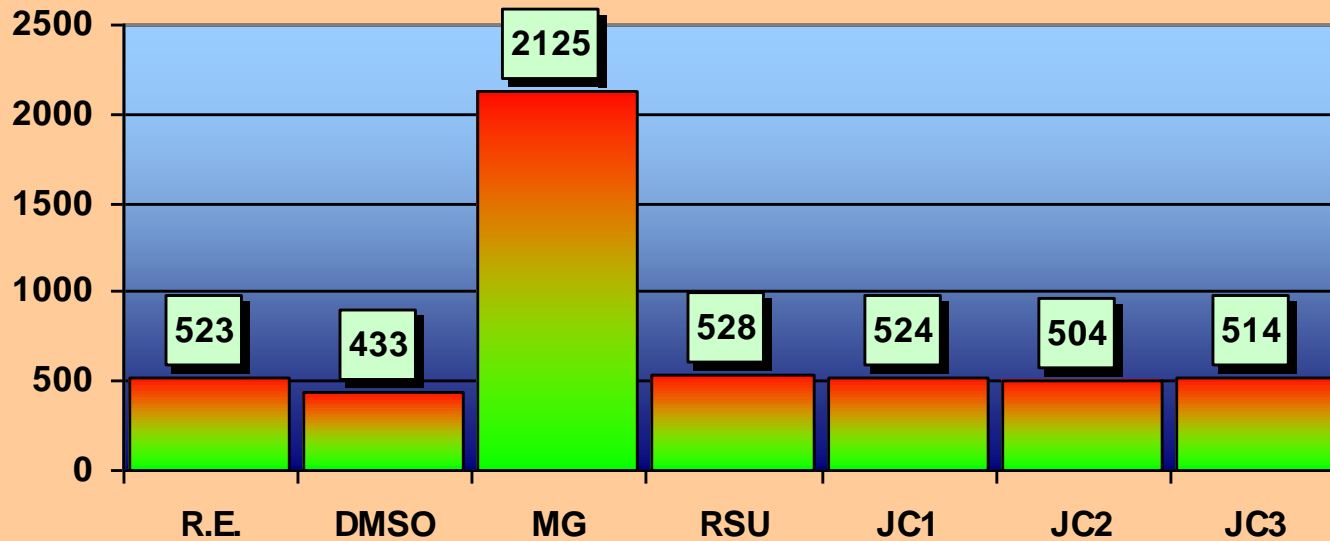


	TA102		
	Reversión	Índice	Clasificación
R.E.	344	1	NM
DMSO	299	0,87	NM
MMS	5761	16,76	M <sup>4</sup>
RSU	274	0,80	NM
JC1	254	0,74	NM
JC2	317	0,92	NM
JC3	310	0,90	NM

CEPA: TA102				
TA102				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
R.E.	337	332	362	344
DMSO	295	304	298	299
MMS	5830	5263	6189	5761
TA102				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
RSU	255	305	262	274
JC1	262	257	242	254
JC2	379	250	321	317
JC3	275	277	377	310



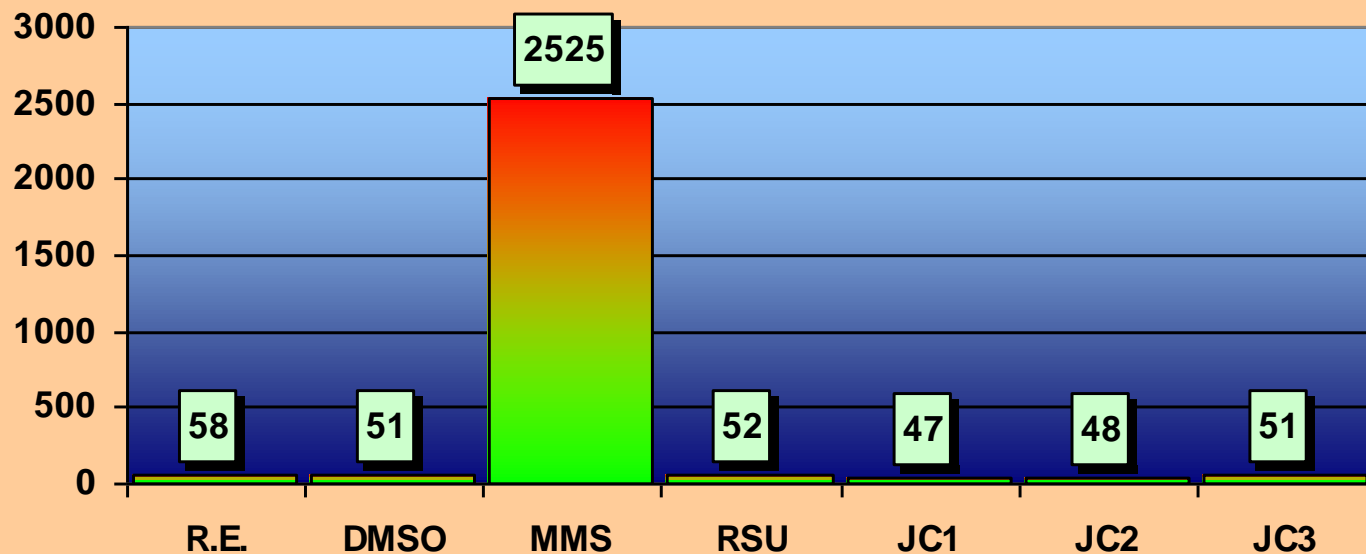
## Nº Revertientes en *Salmonella typhimurium* TA104



TA104			
	Reversión	Índice	Clasificación
R.E.	523	1	NM
DMSO	433	0,83	NM
MG	2125	4,06	M <sup>2</sup>
RSU	528	1,01	NM
JC1	524	1,00	NM
JC2	504	0,96	NM
JC3	514	0,98	NM

CEPA: TA104				
TA104				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
R.E.	534	503	533	523
DMSO	397	457	445	433
MG	2124	2276	1974	2125
TA104				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
RSU	512	574	498	528
JC1	506	554	513	524
JC2	463	561	489	504
JC3	520	526	495	514

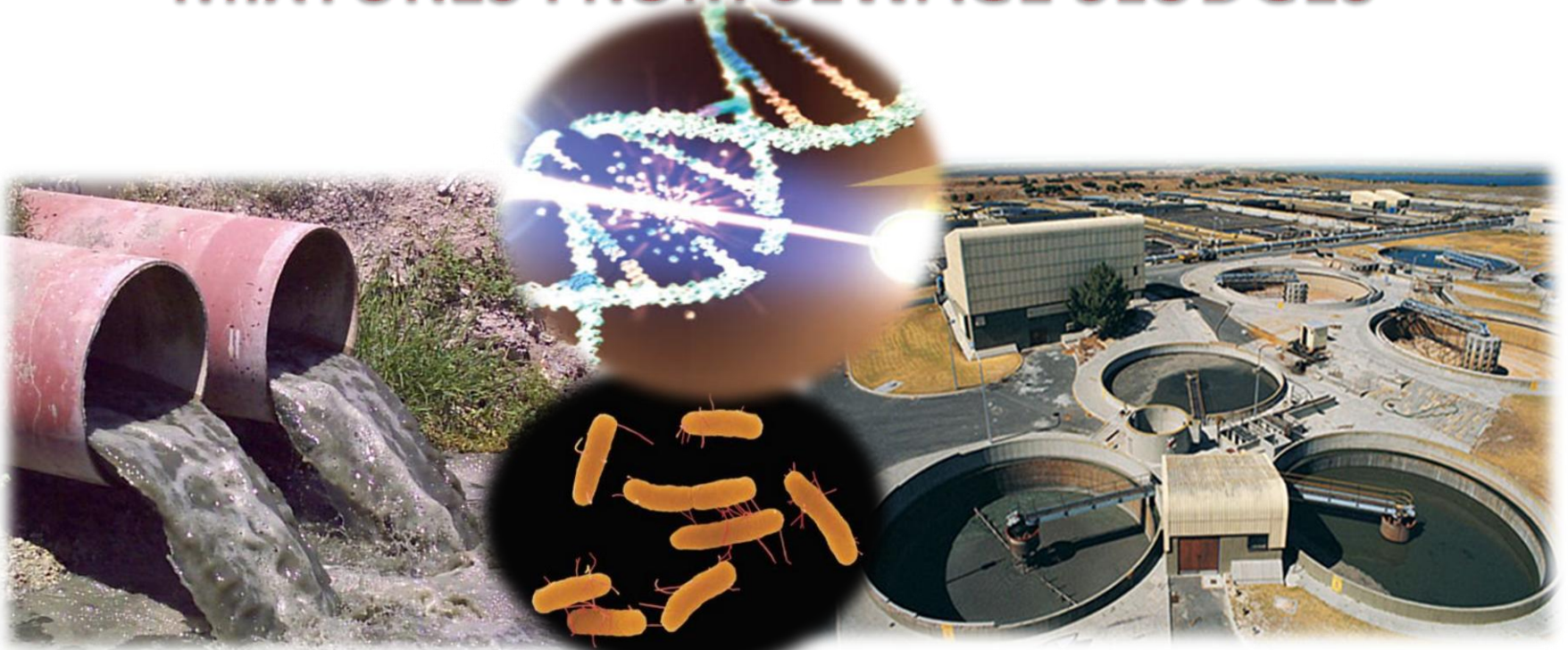
## Nº Revertientes en *Salmonella typhimurium* TA100



	TA100		
	Reversión	Índice	Clasificación
R.E.	58	1	NM
DMSO	51	0,88	NM
MMS	2525	43,78	M <sup>4</sup>
RSU	52	0,91	NM
JC1	47	0,81	NM
JC2	48	0,84	NM
JC3	51	0,88	NM

CEPA: TA100				
TA100				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
R.E.	52	66	55	58
DMSO	43	53	56	51
MMS	2259	2760	2555	2525
TA100				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Media
RSU	49	46	62	52
JC1	47	50	43	47
JC2	46	36	63	48
JC3	61	42	49	51

# GENOTOXIC EVALUATION OF COMPLEX MIXTURES FROM SEWAGE SLUDGES



**Investigación toxicológica de mezclas complejas es uno de los principales focos de la reciente investigación en toxicología.**

**Lodos de aguas residuales es un residuo del proceso de purificación de aguas residuales y se considera una mezcla compleja**



## **Lodos de aguas residuales**



## Evaluación mutagénica de Líquidos de pirólisis – Muestras globales

T=Temperatura de pirólisis; %= dilución de la muestra;

TA98, TA100, TA102 y TA104 = cepas de *Salmonella typhimurium*;

Las tablas muestran el número de colonias revertientes, entre paréntesis los índices de mutación (IM)

Líquido pirólisis Madrid Sur - Global - (Sin S9)					
T <sup>o</sup>	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450 <sup>o</sup> C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	271 (0.0)	300 (0.0)
	15	19 (-0.1)	173 (0.5)	228 (-0.2)	308 (0.0)
	20	15 (-0.3)	188 (0.6)	231 (-0.2)	324 (0.1)
	25	18 (-0.2)	179 (0.5)	209 (-0.3)	314 (0.0)
530 <sup>o</sup> C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	123 (0.1)	316 (0.1)	215 (-0.3)
	20	17 (-0.2)	123 (0.1)	266 (-0.1)	196 (-0.3)
	25	490 (21.0)	101 (-0.1)	212 (-0.3)	135 (-0.5)
650 <sup>o</sup> C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	11 (-0.5)	344 (2.0)	751 (1.6)	91 (-0.7)
	20	0 (-1.0)	0 (-1.0)	0 (-1.0)	6 (-1.0)
	25	0 (-1.0)	0 (-1.0)	0 (-1.0)	0 (-1.0)

Líquido pirólisis Madrid Sur - Global - (Con S9)					
T <sup>o</sup>	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450 <sup>o</sup> C	0	25 (0.0)	102 (0.0)	176 (0.0)	364 (0.0)
	15	24 (0.0)	89 (0.1)	138 (-0.2)	408 (0.1)
	20	10 (-0.6)	107 (0.3)	126 (-0.3)	407 (0.1)
	25	8 (-0.7)	88 (0.1)	174 (0.0)	379 (0.0)
530 <sup>o</sup> C	0	21 (0.0)	103 (0.0)	174 (0.0)	307 (0.0)
	15	18 (-0.1)	1704 (15.6)	0 (-1.0)	1079 (2.5)
	20	953 (44.4)	18 (-0.8)	0 (-1.0)	755 (1.5)
	25	978 (45.6)	0 (-1.0)	0 (-1.0)	91 (-0.7)
650 <sup>o</sup> C	0	No evaluado, ya no hay muestra			
	15				
	20				
	25				

# INCORPORACIÓN EN PLACA ESTANDAR-



T	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450 C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	271 (0.0)	300 (0.0)
	15	19 (-0.1)	173 (0.5)	228 (-0.2)	308 (0.0)
	20	15 (-0.3)	188 (0.6)	231 (-0.2)	324 (0.1)
	25	18 (-0.2)	179 (0.5)	209 (-0.3)	314 (0.0)
530 C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	123 (0.1)	316 (0.1)	215 (-0.3)
	20	17 (-0.2)	123 (0.1)	266 (-0.1)	196 (-0.3)
	25	490 (21.0)	101 (-0.1)	212 (-0.3)	135 (-0.5)
650 C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	11 (-0.5)	344 (2.0)	751 (1.6)	91 (-0.7)
	20	0 (-1.0)	0 (-1.0)	0 (-1.0)	6 (-1.0)
	25	0 (-1.0)	0 (-1.0)	0 (-1.0)	0 (-1.0)



Líquido pirólisis Valladolid – Global - (Sin S9)					
T°	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450°C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	110 (-0.1)	219 (-0.2)	94 (-0.7)
	20	12 (-0.5)	112 (0.0)	209 (-0.3)	2 (-1.0)
	25	14 (-0.5)	142 (0.2)	143 (-0.5)	0 (-1.0)
530°C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	103 (-0.1)	152 (-0.5)	156 (-0.5)
	20	16 (-0.3)	119 (0.0)	152 (0.2)	109 (-0.6)
	25	215 (8.9)	419 (2.6)	0 (-1.0)	75 (-0.7)
650°C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	897 (40.4)	1873 (7.81)	109 (-0.6)	597 (1.0)
	20	32 (0.5)	131 (4.04)	2 (-1.0)	0 (-1.0)
	25	1 (-1.0)	16 (1.53)	1 (-1.0)	0 (-1.0)

Líquido pirólisis Valladolid – Global - (Con S9)					
T°	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450°C	0	21 (0.0)	123 (0.0)	178 (0.0)	362 (0.0)
	15	20 (0.0)	128 (0.0)	187 (0.1)	475 (0.3)
	20	22 (0.0)	110 (-0.1)	152 (-0.1)	395 (0.1)
	25	20 (-0.1)	108 (-0.1)	140 (-0.2)	493 (0.4)
530°C	No evaluado, ya no hay muestra				
650°C	No evaluado, ya no hay muestra				



# INCORPORACIÓN EN PLACA ESTANDAR Mezclas



T	Conc.	TA98	TA100	TA102	TA104
450 C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	110 (-0.1)	219 (-0.2)	94 (-0.7)
	20	12 (-0.5)	112 (0.0)	209 (-0.3)	2 (-1.0)
	25	14 (-0.5)	142 (0.2)	143 (-0.5)	0 (-1.0)
530 C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	103 (-0.1)	152 (-0.5)	156 (-0.5)
	20	16 (-0.3)	119 (0.0)	152 (0.2)	109 (-0.6)
	25	215 (8.9)	419 (2.6)	0 (-1.0)	75 (-0.7)
650 C	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	897 (40.4)	1873 (7.81)	109 (-0.6)	597 (1.0)
	20	32 (0.5)	131 (4.04)	2 (-1.0)	0 (-1.0)
	25	1 (-1.0)	16 (1.53)	1 (-1.0)	0 (-1.0)





## Comparación de métodos para ver el efecto de los compuestos volátiles

IPE = Incorporación en placa estándar

IPLV = Incorporación en placa para líquidos volátiles

IPPI = Incorporación en placa con preincubación

LÍQUIDOS VOLÁTILES Y PRE-INCUBACIÓN Valladolid 530°C					
T°	Conc.	TA98	TA100	TA102	TA104
IPE	0	22 (0.0)	116 (0.0)	285 (0.0)	300 (0.0)
	15	13 (-0.4)	103 (-0.1)	152 (-0.5)	156 (-0.5)
	20	16 (-0.3)	119 (0.0)	152 (0.2)	109 (-0.6)
	25	215 (8.9)	419 (2.6)	0 (-1.0)	75 (-0.7)
IPLV	0	24 (0.0)	117 (0.0)	221 (0.0)	316 (0.0)
	15	50 (1.15)	85 (-0.3)	54 (-0.8)	13 (-1.0)
	20	58 (0.3)	81 (-0.3)	30 (-0.9)	11 (-1.0)
	25	64 (1.7)	53 (-0.5)	18 (-0.9)	2 (-1.0)
IPPI	0	24 (0.0)	139 (0.0)	225 (0.0)	310 (0.0)
	15	7 (-0.7)	31 (-0.8)	27 (-0.9)	7 (-1.0)
	20	4 (-0.8)	17 (-0.9)	20 (-0.9)	7 (-1.0)
	25	3 (-0.9)	14 (-0.9)	17 (-0.9)	6 (-1.0)



MIDDLE Madrid Sur (Sin S9)					
T°	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450°C	0	17 (0.0)	116 (0.0)	261 (0.0)	291 (0.0)
	2	17 (-0.3)	98 (-0.4)	116 (-0.6)	101 (-0.7)
	3	16 (-0.3)	88 (-0.5)	79 (-0.7)	93 (-0.7)
	4	18 (-0.2)	89 (-0.5)	51 (-0.8)	71 (-0.8)
530°C	0	17 (0.0)	116 (0.0)	261 (0.0)	291 (0.0)
	2	29 (0.2)	107 (-0.4)	256 (-0.2)	49 (-0.8)
	3	70 (2.0)	95 (-0.5)	932 (2.1)	21 (-0.9)
	4	259 (10.1)	73 (-0.6)	1,464 (3.8)	10 (-1.0)
650°C	0	17 (0.0)	116 (0.0)	261 (0.0)	291 (0.0)
	2	1,845 (78.1)	63 (-0.6)	578 (0.9)	13 (-1.0)
	3	234 (9.0)	53 (-0.7)	151 (-0.5)	26 (-0.9)
	4	0 (-1.0)	65 (-0.6)	0 (-1.0)	369 (0.3)

MIDDLE Valladolid (Sin S9)					
T°	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450°C	NO SE RECIBIO MUESTRA				
530°C	NO SE RECIBIO MUESTRA				
650°C	NO EVALUADO, MUESTRA INSUFICIENTE				

BOTTOM Madrid Sur (Sin S9)					
T°	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450°C	0	17 (0.0)	116 (0.0)	261 (0.0)	291 (0.0)
	50	17 (0.0)	106 (-0.4)	166 (-0.5)	256 (-0.5)
	60	19 (0.1)	106 (-0.4)	181 (-0.4)	164 (-0.4)
	70	17 (0.0)	116 (-0.4)	184 (-0.4)	163 (-0.4)
530°C	0	17 (0.0)	116 (0.0)	261 (0.0)	291 (0.0)
	50	11 (-0.3)	99 (-0.4)	155 (-0.5)	240 (-0.2)
	60	16 (-0.1)	91 (-0.5)	132 (-0.6)	220 (-0.3)
	70	17 (0.0)	93 (-0.5)	146 (-0.5)	226 (-0.3)
650°C	0	17 (0.0)	116 (0.0)	261 (0.0)	291 (0.0)
	50	21 (0.2)	119 (-0.3)	240 (-0.2)	124 (-0.6)
	60	20 (0.2)	112 (-0.4)	185 (-0.4)	127 (-0.6)
	70	197 (10.4)	94 (-0.5)	164 (-0.5)	126 (-0.6)

BOTTOM Valladolid (Sin S9)					
T°	%	TA98	TA100	TA102	TA104
450°C	0	21 (0.0)		245 (0.0)	
	50	24 (0.2)	No evaluado, ya no hay muestra	134 (-0.5)	No evaluado, ya no hay muestra
	60	23 (0.1)		168 (-0.3)	
	70	23 (0.1)		136 (-0.4)	
530°C	0	21 (0.0)		245 (0.0)	
	50	24 (0.2)	No evaluado, ya no hay muestra	189 (-0.2)	No evaluado, ya no hay muestra
	60	24 (0.2)		171 (-0.3)	
	70	23 (0.1)		177 (-0.3)	
650°C	0	21 (0.0)		245 (0.0)	
	50	21 (0.0)	No evaluado, ya no hay muestra	182 (-0.3)	No evaluado, ya no hay muestra
	60	21 (0.0)		161 (-0.3)	
	70	29 (0.0)		169 (-0.3)	

# Ames Salmonella/microsome RESULTS

T	%	TA98		TA100		TA102	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9

450 C	0	22 (0.0)	25 (0.0)	116 (0.0)	102 (0.0)	271 (0.0)	176 (0.0)
	15	19 (-0.1)	24 (0.0)	173 (0.5)	89 (0.1)	228 (-0.2)	138 (-0.2)
	20	15 (-0.3)	10 (-0.6)	188 (0.6)	107 (0.3)	231 (-0.2)	126 (-0.3)
	25	18 (-0.2)	8 (-0.7)	179 (0.5)	88 (0.1)	209 (-0.3)	174 (0.0)
530 C	0	22 (0.0)	21 (0.0)	116 (0.0)	103 (0.0)	285 (0.0)	174 (0.0)
	15	13 (-0.4)	18 (-0.1)	123 (0.1)	1704 (15.6)	316 (0.1)	0 (-1.0)
	20	17 (-0.2)	953 (44.4)	123 (0.1)	18 (-0.8)	266 (-0.1)	0 (-1.0)
	25	490 (21.0)	978 (45.6)	101 (-0.1)	0 (-1.0)	212 (-0.3)	0 (-1.0)

## Mutagenic evaluation of trichlorfon using different assay methods with *Salmonella typhimurium*

Carmen Barrueco<sup>1</sup>, Angustias Herrera<sup>1</sup> and Eduardo de la Peña



Mutation Research 414 (1998) 1-7



## Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes

Ana Guadaño<sup>\*</sup>, Azucena González-Coloma, Eduardo de la Peña

Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, c/ Serrano 115 dpdo, 28006 Madrid, Spain

Received 28 November 1997; revised 10 February 1998; accepted 10 February 1998

En: de la Peña E, Burgaste I, Guadaño A (1999) Evaluación Mutagénica y Genotóxica. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Sociedad Española de Mutagenesis Ambiental, MRCA198. Madrid. 249-260

## MULTICOLOR FISH USING TANDEM PROBES TO DETECT CHROMOSOME ALTERATIONS IN HUMANS CELLS AND POPULATIONS EXPOSED TO GENOTOXIC AGENTS

DAVID A. EASTMOND<sup>1</sup>, DOPPALAPUDI S. RUPA<sup>1</sup>, MAIK J. SCHULER<sup>1</sup>, MICHELLE N. MURG<sup>1</sup> AND EDUARDO DE LA PEÑA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Environmental Toxicology Graduate Program, University of California Riverside, U.S.A.  
<sup>2</sup>Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Ciencias Medioambientales.

Environmental and Molecular Mutagenesis 20:218-222 (1992)

## Effect of Permethrin on the Induction of Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei in Cultured Human Lymphocytes

Angustias Herrera, Carmen Barrueco, Covadonga Caballo, and Eduardo de la Peña  
Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Instituto de Salud Carlos III (A.H., C.B., C.C.) and Centro de Ciencias Medioambientales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (E.d.l.P.), Madrid, Spain

Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 14:31-38 (1994)

## Induction of Structural Chromosome Aberrations in Human Lymphocyte Cultures and CHO Cells by Permethrin

Carmen Barrueco, Angustias Herrera, Covadonga Caballo, and Eduardo de la Peña

Toxicology in Vitro 22 (2008) 1228-1233

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxinvit](http://www.elsevier.com/locate/toxinvit)

## *In vitro* assessment of the cytotoxic and mutagenic potential of perfluorooctanoic acid

P. Fernández Freire<sup>a</sup>, J.M. Pérez Martín<sup>a</sup>, O. Herrero<sup>a,b</sup>, A. Peropadre<sup>a</sup>, E. de la Peña<sup>b</sup>, M.J. Hazen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología, Edificio de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin, 2, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain  
<sup>b</sup>Grupo de Mutagenesis Ambiental, Centro de Ciencias Medioambientales CSIC, 28006 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 7 February 2008  
Accepted 9 April 2008  
Available online 15 April 2008

Keywords:  
Perfluorooctanoic acid  
Cytotoxicity  
Mutagenicity  
*In vitro* bioassays

### ABSTRACT

Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a perfluorinated compound ubiquitously detected in the environment, including wildlife and humans. Despite the available information, research on the cytotoxicity of PFOA in non-tumoral mammalian cells is relatively limited. In this work, two *in vitro* toxicity systems were employed to provide further insight into the cytotoxic and mutagenic potential of PFOA. The cytotoxicity of the chemical towards Vero cells was assessed using biochemical and morphological parameters, while mutagenicity was evaluated according to Ames test. High doses of PFOA cause oxidative stress in Vero cells, that was closely linked to cell cycle arrest at the G1 phase and induction of apoptosis. Our results corroborate previous findings in human tumoral cells and suggest that the mode of action of this perfluorinated compound is not a peculiarity among mammalian cell types. On the other hand, the compound was not mutagenic in the Ames test, using four strains of *Salmonella typhimurium* in the presence or absence of rat S9 metabolic activation system.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

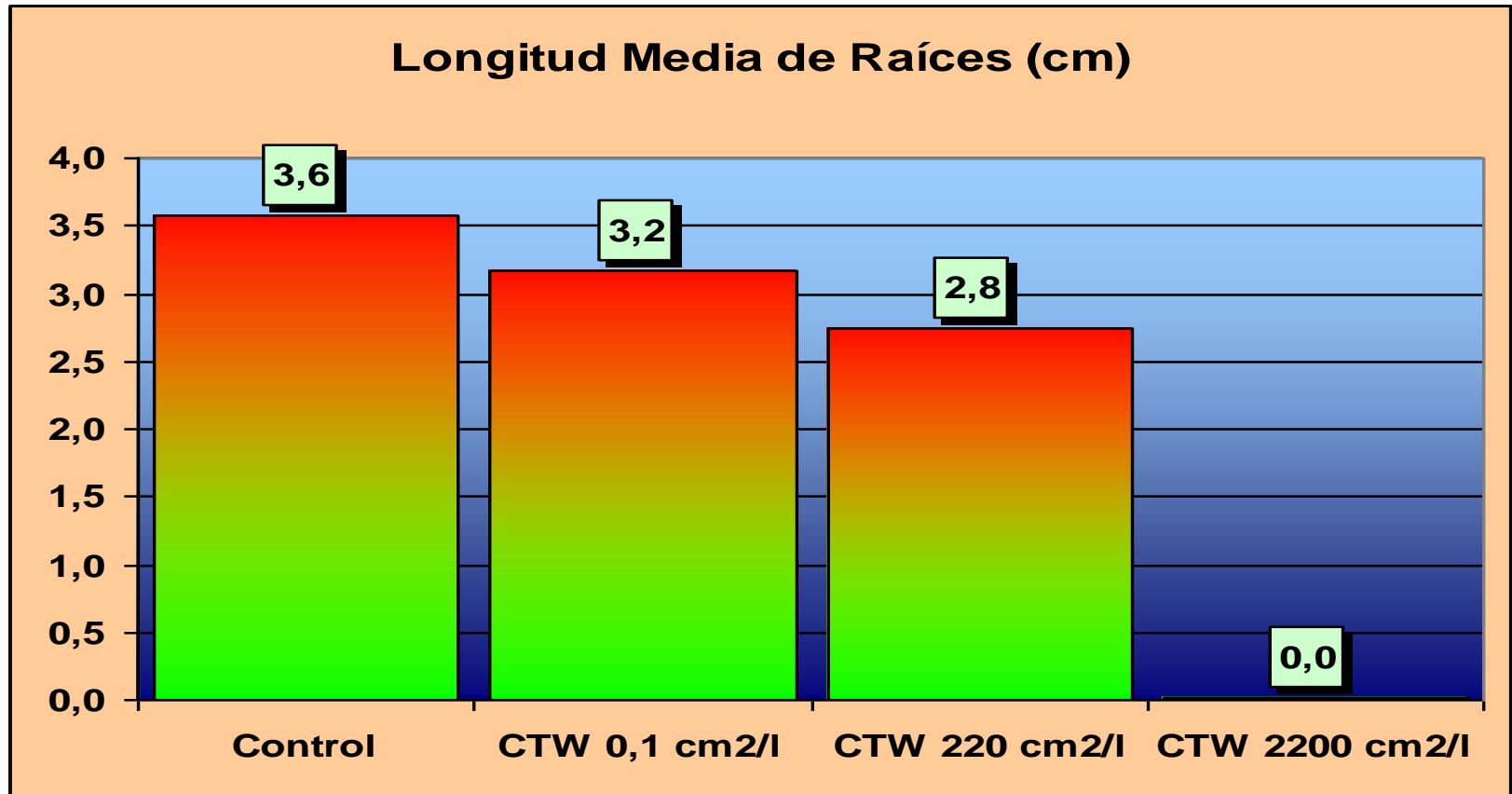
Cell Biology in Environmental Toxicology  
M.F. Cajaville, editor, pp. 289-299  
I.S.B.N.: 84-7385-666-7  
Copyright © 1995 University of the Basque Country Press Service, Bilbao  
All rights of reproduction in any form reserved

## Chapter 12

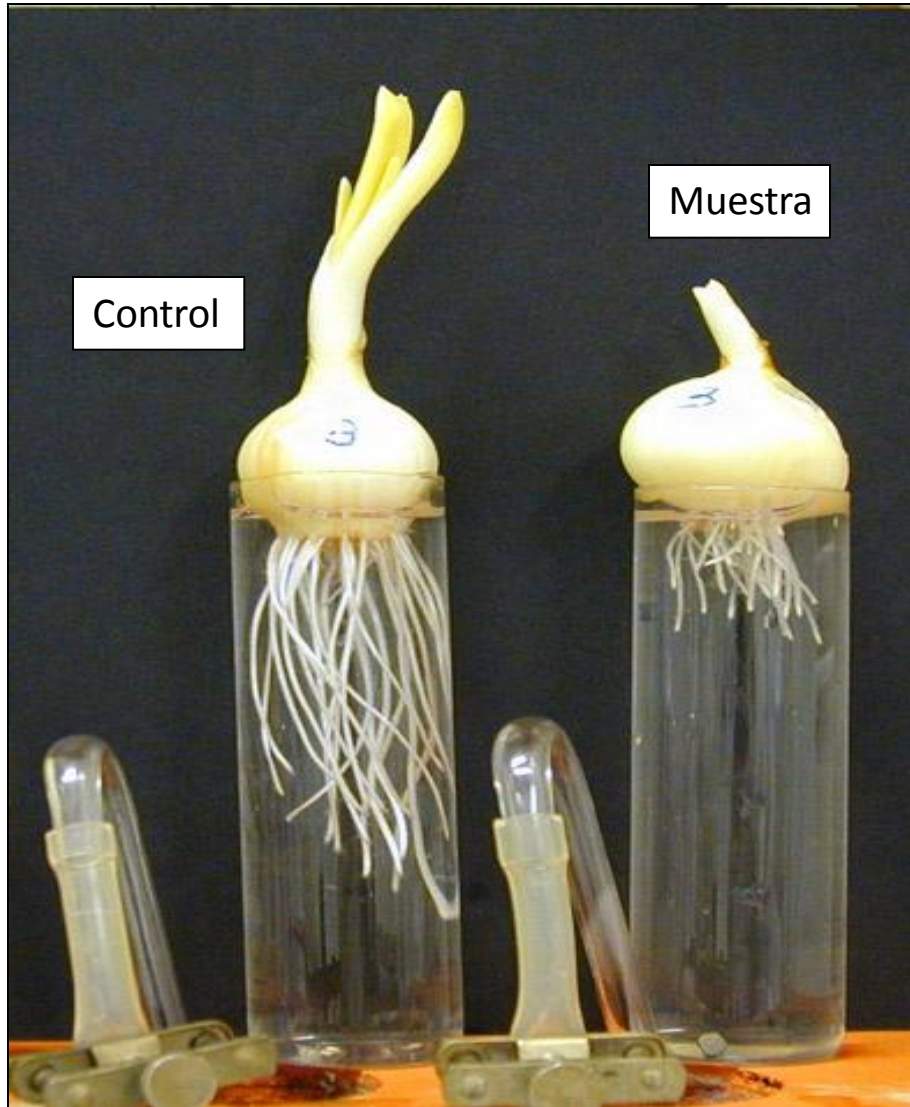
### Genotoxic and cytotoxic effects of pesticides

E. de la Peña, C. Barrueco, A. Herrera and C. Caballo  
CSIC, Centro de Ciencias Medioambientales, Mutagenesis Ambiental/Genotoxicología,  
C/ Serrano 115, apdo, 28006 Madrid, España

# FITOTOXICIDAD:



# RESULTADOS *Allium cepa*:



**Inhibición del  
crecimiento  
radicular**

**Crecimiento Radicular:  
Inhibición entre 80-90%**

**Índice Mitótico:  
Parada del ciclo  
celular en  
PROFASE**

	Resumen				
	Total IF	Total PF	Total MF	Total AF	Total TF
Control A	0	0	0	0	0
Control B	0	0	0	0	0
M1	950	23	11	7	11
M2	931	46	9	5	9
M3	972	28	0	0	0
M4	953	48	0	0	0
M5	0	0	0	0	0
M6	0	0	0	0	0
M7	0	0	0	0	0
M8	0	0	0	0	0
M9	186	14	0	0	0
M10	183	18	0	0	0
M11	194	6	0	0	0
M12	194	6	0	0	0
M13	0	0	0	0	0



## Test de Allium cepa

### Índices Mitóticos tras 48h de Tratamiento

Control A	Agua
Control B	Agua
M1	CTW 0,1cm2/l
M2	CTW 0,1cm2/l
M3	CTW 0,5cm2/l
M4	CTW 0,5cm2/l
M5	CTW 1cm2/l
M6	CTW 1cm2/l
M7	CTW 110cm2/l
M8	CTW 110cm2/l
M9	CTW 1100cm2/l
M10	CTW 1100cm2/l
M11	CTW 2200cm2/l
M12	CTW 2200cm2/l

	Índice Mitótico				
	Interfases	Fases	I+F	Total Contadas	Índice
Control A	0	0	0	0	#¡DIV/0!
Control B	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M1	950	52	1002	1000	5,2
M2	931	69	1000	1000	6,9
M3	972	28	1000	1000	2,8
M4	953	48	1001	1000	4,8
M5	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M6	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M7	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M8	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M9	186	14	200	200	6,85
M10	183	18	200	200	8,75
M11	194	6	200	200	3,05
M12	194	6	200	200	2,8
M13	0	0	0	0	#¡DIV/0!



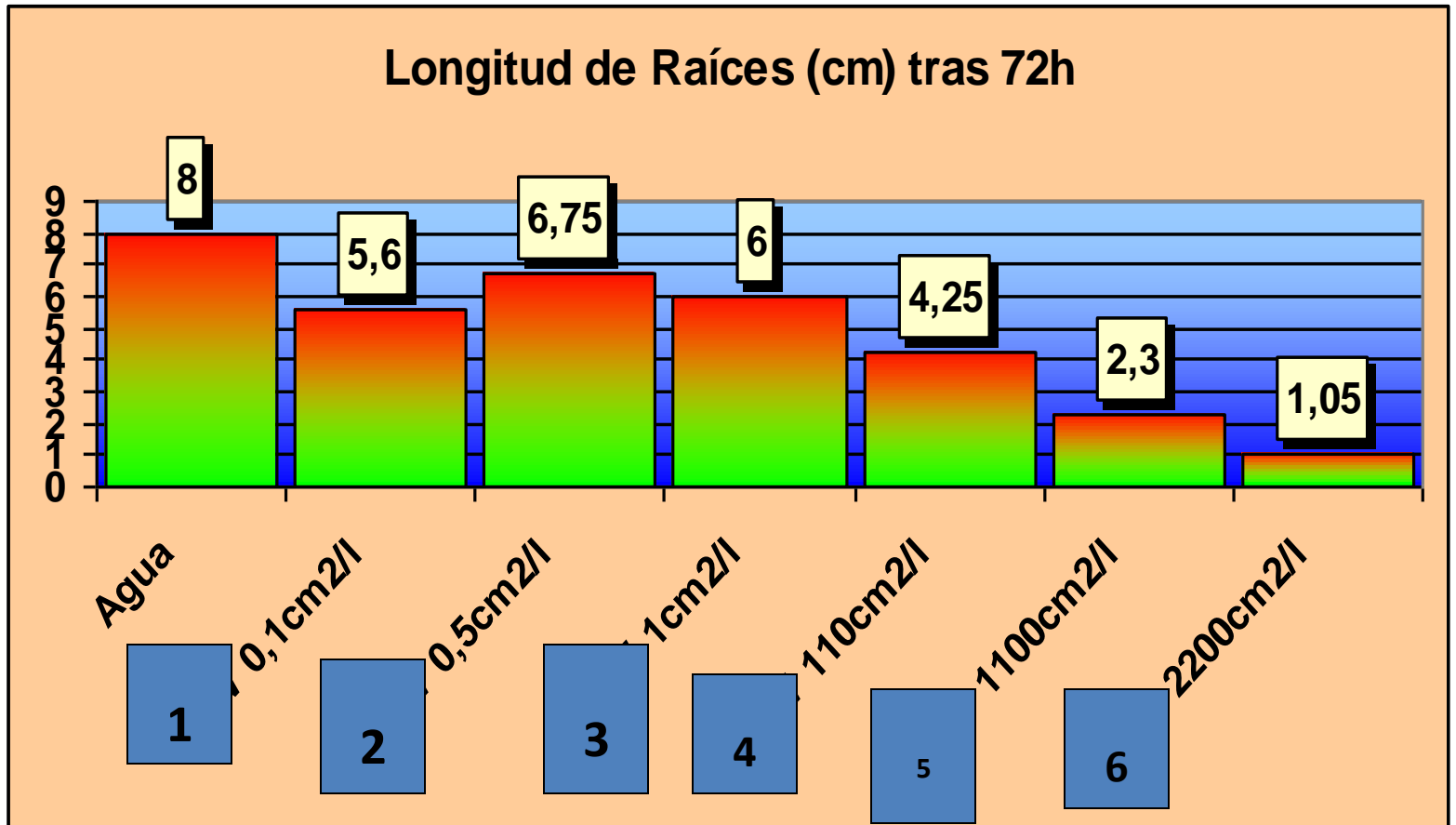
Control Índice Sin Tratar												
		Interfases (IF)	Total IF	Profases (PF)	Total PF	Metafases (MF)	Total MF	Anafases (AF)	Total AF	Telofases (TF)	Total TF	Contadas
Control A	R1.1		0		0		0		0		0	
Control A	R1.2		0		0		0		0		0	
Control A	R2.1		0		0		0		0		0	
Control A	R2.2		0		0		0		0		0	
Control B	R1.1		0		0		0		0		0	
Control B	R1.2		0		0		0		0		0	
Control B	R2.1		0		0		0		0		0	
Control B	R2.2		0		0		0		0		0	
M1	R1.1	482	482	9	9	5	5	1	1	4	4	500
M1	R1.2		482		9		5		1		4	
M1	R2.1	468	468	14	14	6	6	6	6	7	7	500
M1	R2.2		468		14		6		6		7	
M2	R1.1	468	468	19	19	5	5	1	1	7	7	500
M2	R1.2		468		19		5		1		7	
M2	R2.1	463	463	27	27	4	4	4	4	2	2	500
M2	R2.2		463		27		4		4		2	
M3	R1.1	483	483	17	17	0	0	0	0	0	0	500
M3	R1.2		483		17		0		0		0	
M3	R2.1	489	489	11	11	0	0	0	0	0	0	500
M3	R2.2		489		11		0		0		0	
M4	R1.1	475	475	25	25	0	0	0	0	0	0	500
M4	R1.2		475		25		0		0		0	
M4	R2.1	478	478	23	23	0	0	0	0	0	0	500
M4	R2.2		478		23		0		0		0	



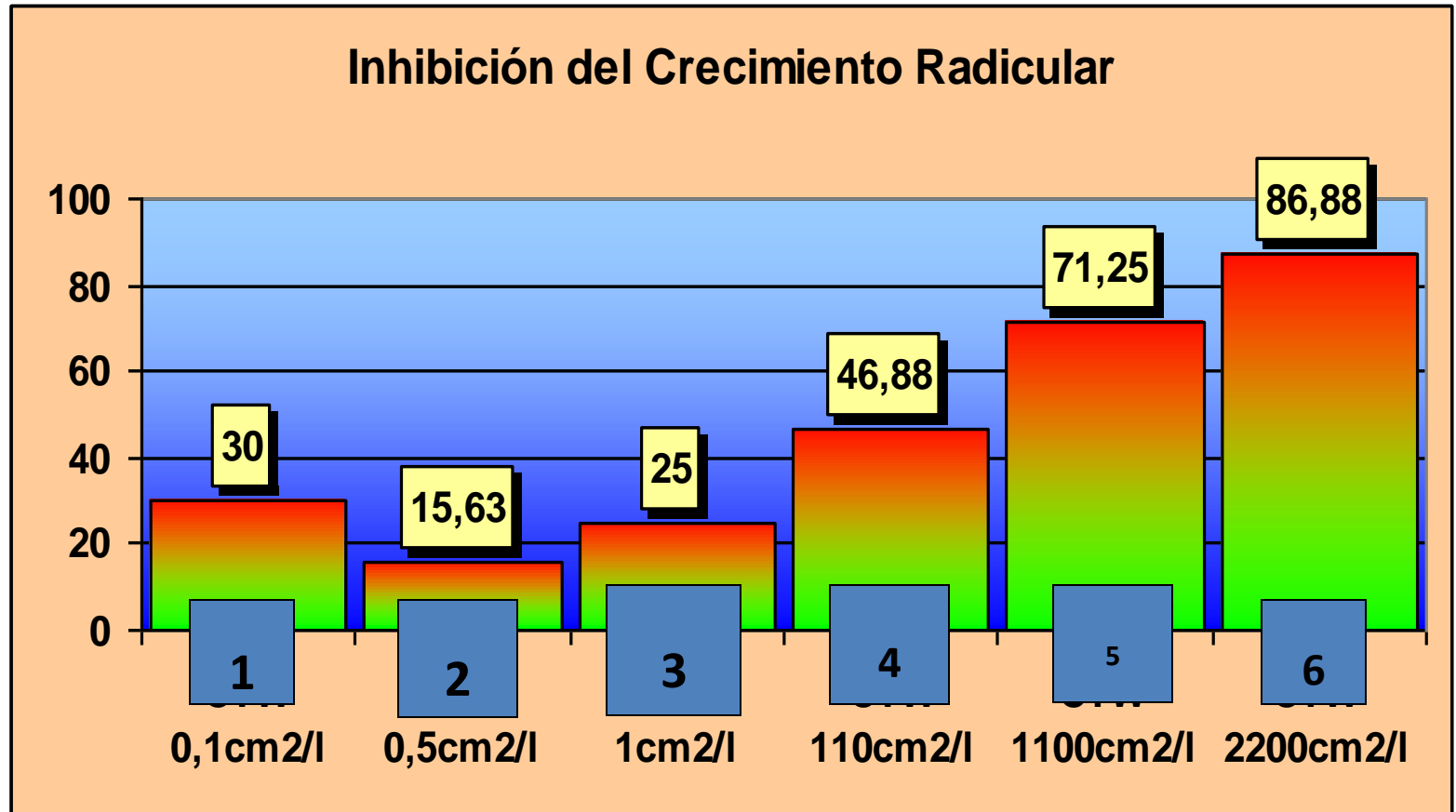
Control Índice Sin Tratar												
		Interfases (IF)	Total IF	Profases (PF)	Total PF	Metafases (MF)	Total MF	Anafases (AF)	Total AF	Telofases (TF)	Total TF	Contadas
Control A	R1.1		0		0		0		0		0	
Control A	R1.2		0		0		0		0		0	
Control A	R2.1		0		0		0		0		0	
Control A	R2.2		0		0		0		0		0	
Control B	R1.1		0		0		0		0		0	
Control B	R1.2		0		0		0		0		0	
Control B	R2.1		0		0		0		0		0	
Control B	R2.2		0		0		0		0		0	
M1	R1.1	482	482	9	9	5	5	1	1	4	4	500
M1	R1.2		482		9		5		1		4	
M1	R2.1	468	468	14	14	6	6	6	6	7	7	500
M1	R2.2		468		14		6		6		7	
M2	R1.1	468	468	19	19	5	5	1	1	7	7	500
M2	R1.2		468		19		5		1		7	
M2	R2.1	463	463	27	27	4	4	4	4	2	2	500
M2	R2.2		463		27		4		4		2	
M3	R1.1	483	483	17	17	0	0	0	0	0	0	500
M3	R1.2		483		17		0		0		0	
M3	R2.1	489	489	11	11	0	0	0	0	0	0	500
M3	R2.2		489		11		0		0		0	
M4	R1.1	475	475	25	25	0	0	0	0	0	0	500
M4	R1.2		475		25		0		0		0	
M4	R2.1	478	478	23	23	0	0	0	0	0	0	500
M4	R2.2		478		23		0		0		0	



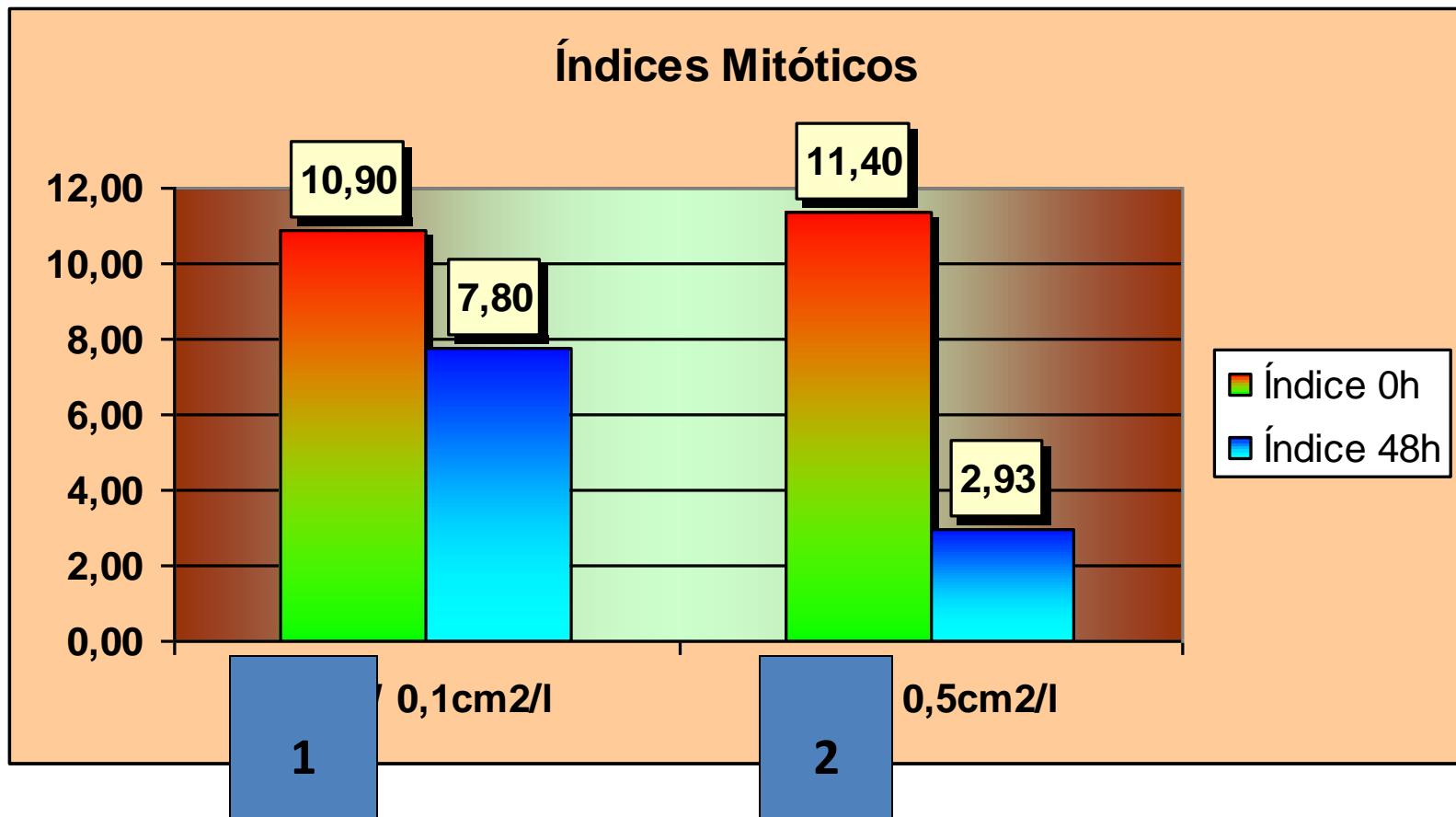
# RESULTADOS *Allium cepa*:



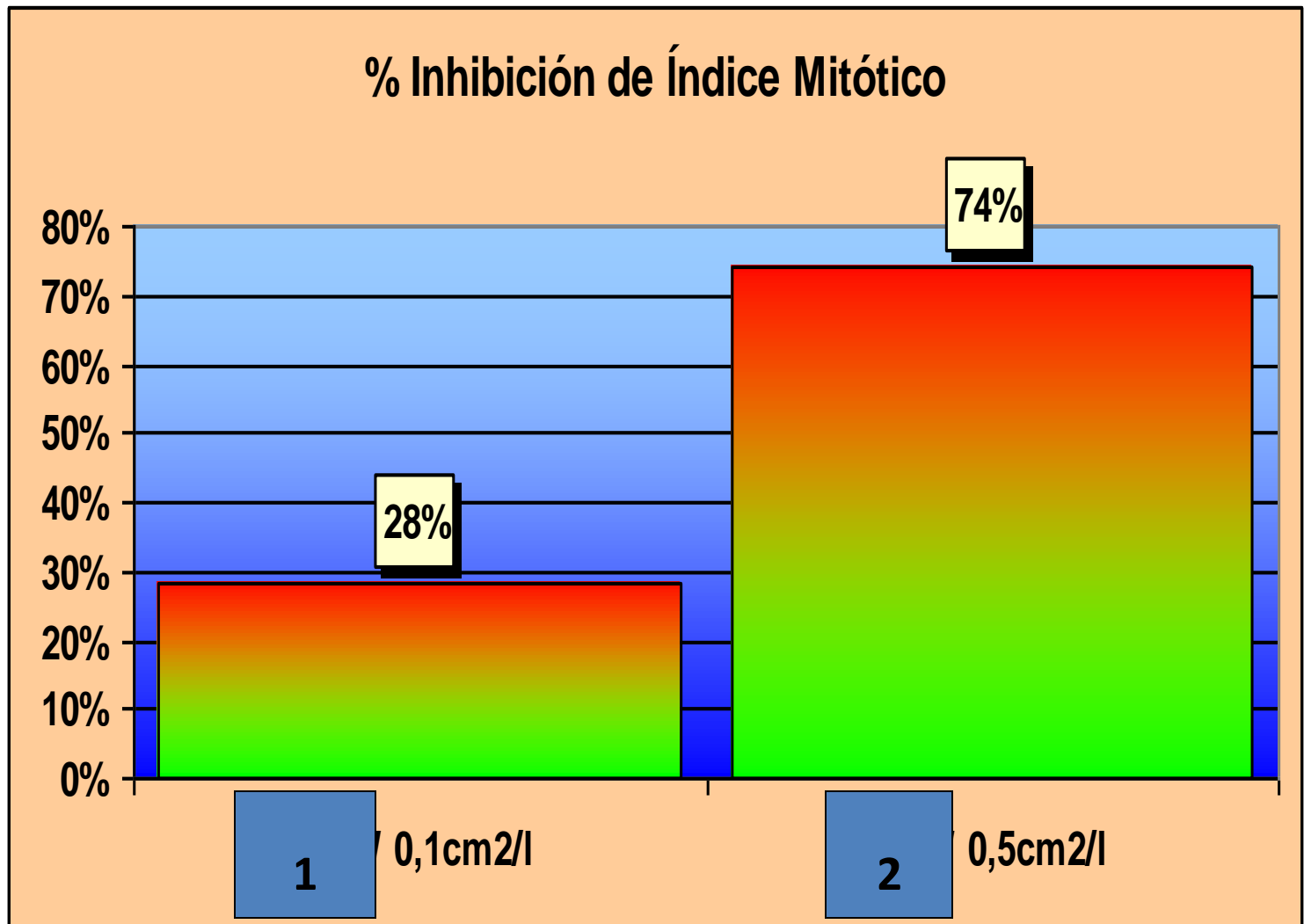
# RESULTADOS *Allium cepa*:



# RESULTADOS *Allium cepa*:

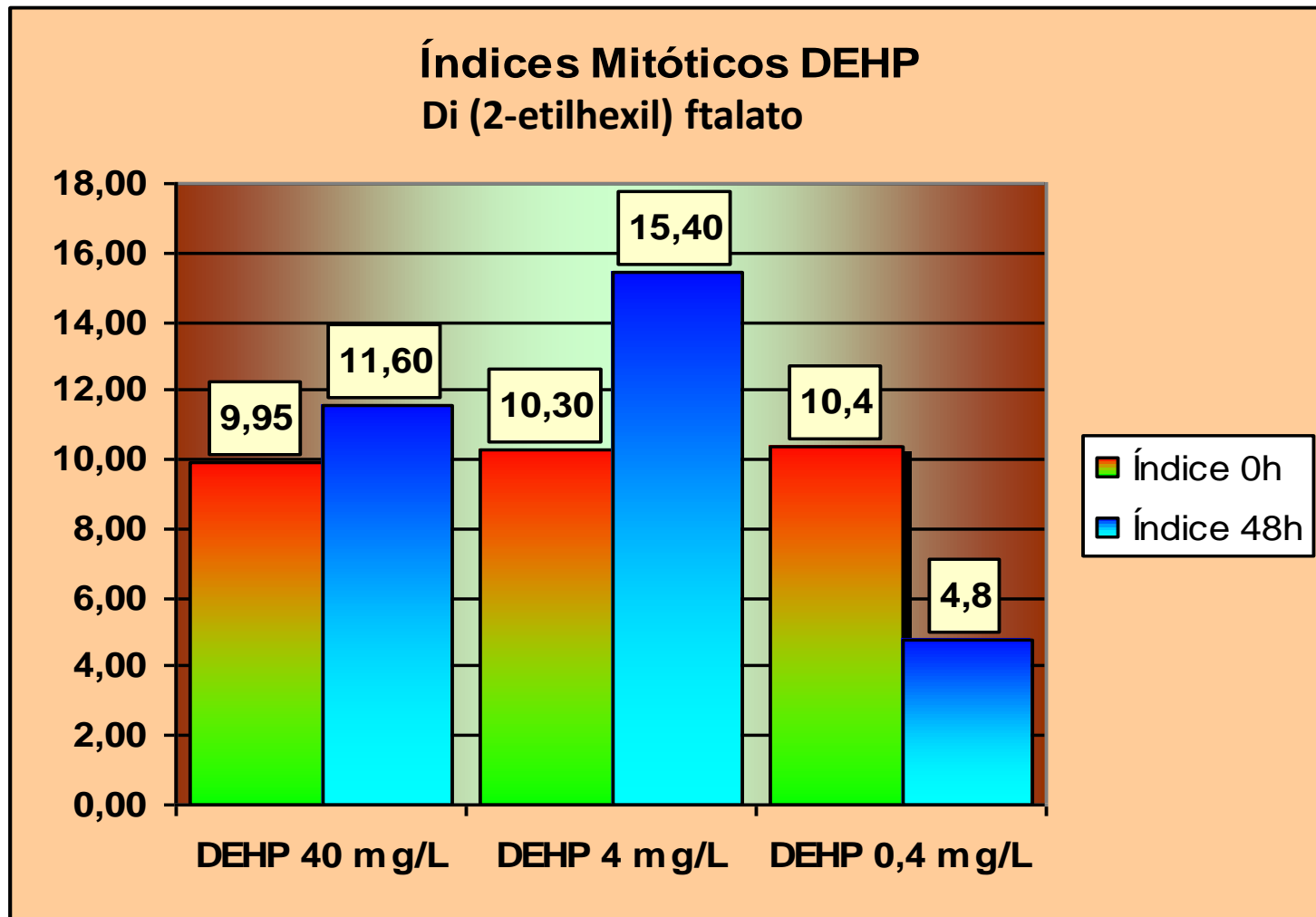


# RESULTADOS *Allium cepa*:



# RESULTADOS PRELIMINARES

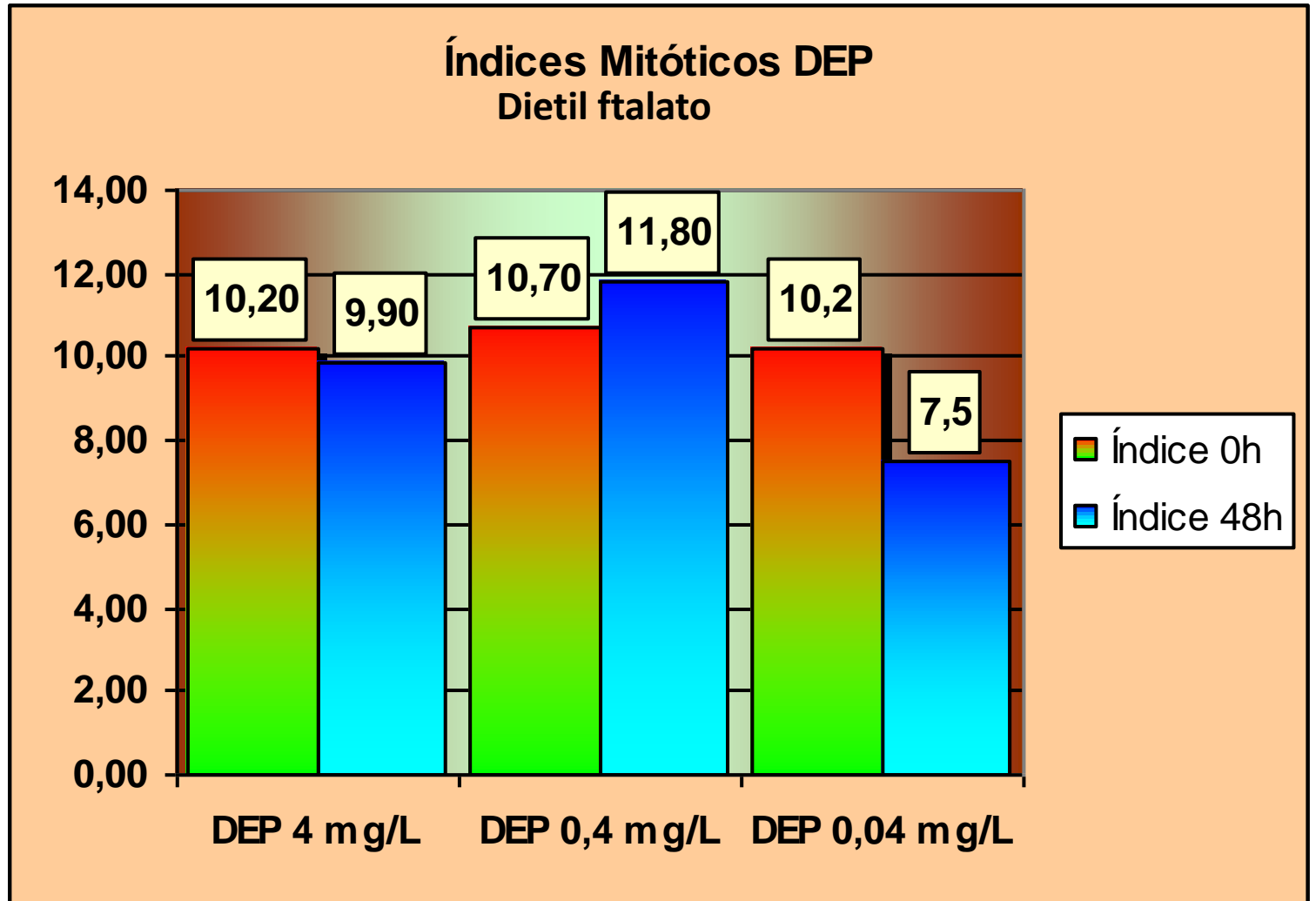
*Allium cepa* (2/3)



DEHP = Di (2-etilhexil) ftalato (CAS 117-81-7)

# RESULTADOS PRELIMINARES

*Allium cepa* (3/3)

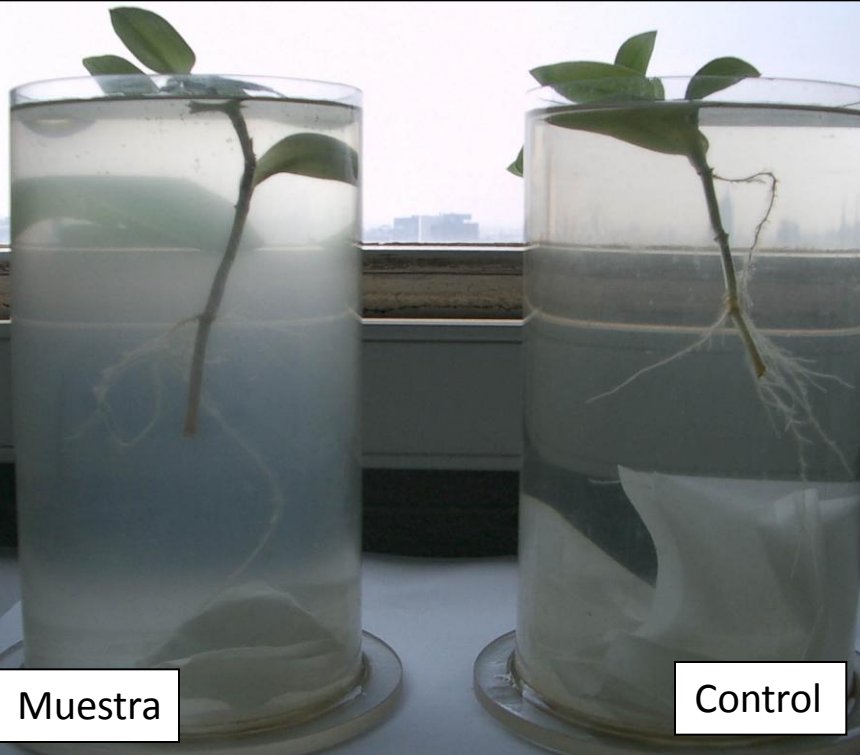


DEP = Dietil ftalato (CAS 84-66-2)

# RESULTADOS *Tradescantia sp.*:

Crecimiento radicular

Día 0



Día 37



- Lote 31
- Control: papel de filtro

**Test de Allium cepa**

Índices Mitóticos tras 48h de Tratamiento

	Resumen				
	Total IF	Total PF	Total MF	Total AF	Total TF
Control A	0	0	0	0	0
Control B	0	0	0	0	0
M1	950	23	11	7	11
M2	931	46	9	5	9
M3	972	28	0	0	0
M4	953	48	0	0	0
M5	0	0	0	0	0
M6	0	0	0	0	0
M7	0	0	0	0	0
M8	0	0	0	0	0
M9	186	14	0	0	0
M10	183	18	0	0	0
M11	194	6	0	0	0
M12	194	6	0	0	0
M13	0	0	0	0	0

Control A	Agua
Control B	Agua
M1	CTW 0,1cm2/l
M2	CTW 0,1cm2/l
M3	CTW 0,5cm2/l
M4	CTW 0,5cm2/l
M5	CTW 1cm2/l
M6	CTW 1cm2/l
M7	CTW 110cm2/l
M8	CTW 110cm2/l
M9	CTW 1100cm2/l
M10	CTW 1100cm2/l
M11	CTW 2200cm2/l
M12	CTW 2200cm2/l

	Índice Mitótico				
	Interfases	Fases	I+F	Total Contadas	Índice
Control A	0	0	0	0	#¡DIV/0!
Control B	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M1	950	52	1002	1000	5,2
M2	931	69	1000	1000	6,9
M3	972	28	1000	1000	2,8
M4	953	48	1001	1000	4,8
M5	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M6	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M7	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M8	0	0	0	0	#¡DIV/0!
M9	186	14	200	200	6,85
M10	183	18	200	200	8,75
M11	194	6	200	200	3,05
M12	194	6	200	200	2,8
M13	0	0	0	0	#¡DIV/0!



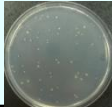
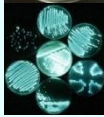
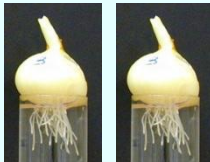
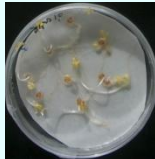




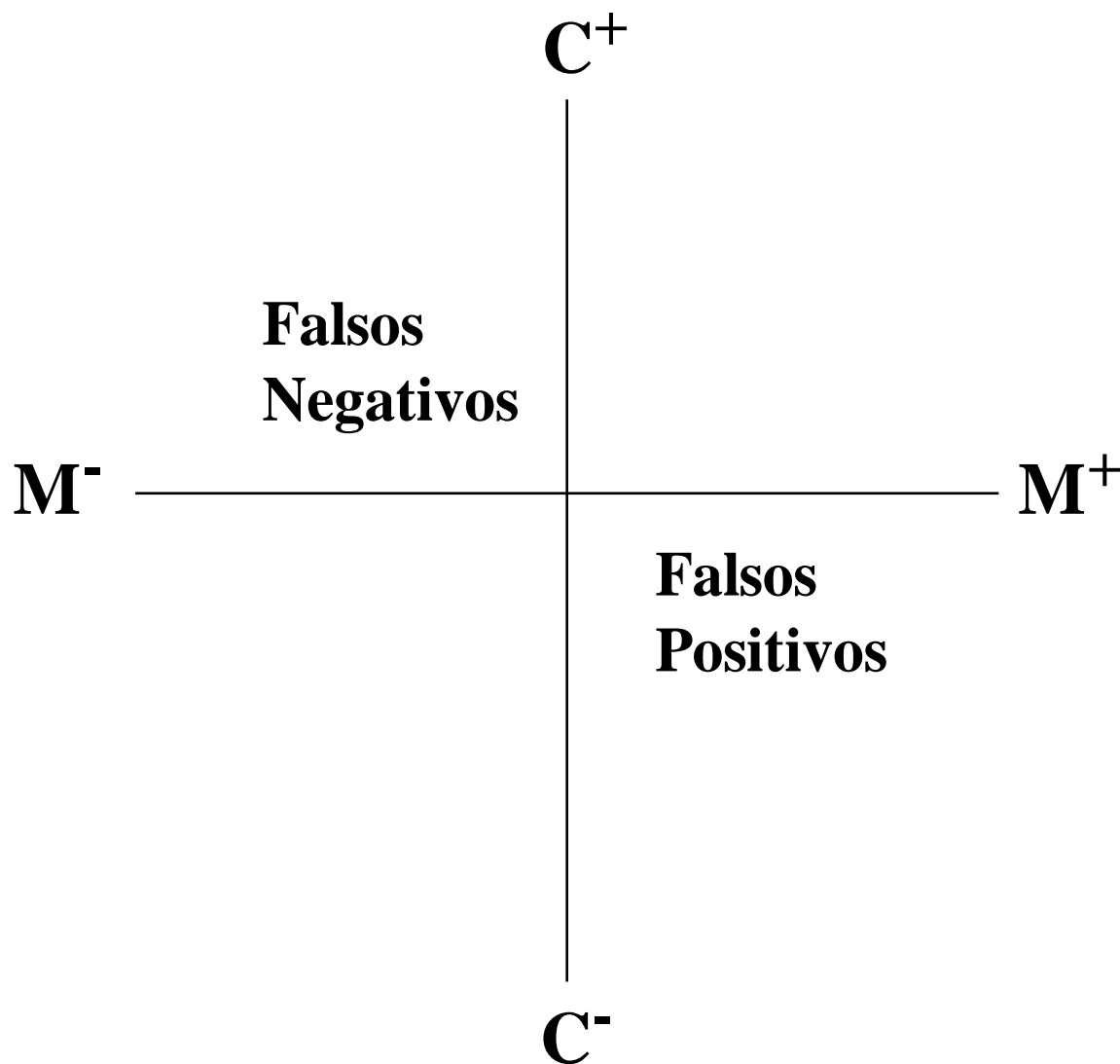
		Control Índice Sin Tratar										
		Interfases (IF)	Total IF	Profases (PF)	Total PF	Metafases (MF)	Total MF	Anafases (AF)	Total AF	Telofases (TF)	Total TF	Contadas
Control A	R1.1		0		0		0		0		0	
Control A	R1.2		0		0		0		0		0	
Control A	R2.1		0		0		0		0		0	
Control A	R2.2		0		0		0		0		0	
Control B	R1.1		0		0		0		0		0	
Control B	R1.2		0		0		0		0		0	
Control B	R2.1		0		0		0		0		0	
Control B	R2.2		0		0		0		0		0	
M1	R1.1	482	482	9	9	5	5	1	1	4	4	500
M1	R1.2		482		9		5		1		4	
M1	R2.1	468	468	14	14	6	6	6	6	7	7	500
M1	R2.2		468		14		6		6		7	
M2	R1.1	468	468	19	19	5	5	1	1	7	7	500
M2	R1.2		468		19		5		1		7	
M2	R2.1	463	463	27	27	4	4	4	4	2	2	500
M2	R2.2		463		27		4		4		2	
M3	R1.1	483	483	17	17	0	0	0	0	0	0	500
M3	R1.2		483		17		0		0		0	
M3	R2.1	489	489	11	11	0	0	0	0	0	0	500
M3	R2.2		489		11		0		0		0	
M4	R1.1	475	475	25	25	0	0	0	0	0	0	500
M4	R1.2		475		25		0		0		0	
M4	R2.1	478	478	23	23	0	0	0	0	0	0	500
M4	R2.2		478		23		0		0		0	

		Control Índice Sin Tratar										
		Interfases (IF)	Total IF	Profases (PF)	Total PF	Metafases (MF)	Total MF	Anafases (AF)	Total AF	Telofases (TF)	Total TF	Contadas
Control A	R1.1		0		0		0		0		0	
Control A	R1.2		0		0		0		0		0	
Control A	R2.1		0		0		0		0		0	
Control A	R2.2		0		0		0		0		0	
Control B	R1.1		0		0		0		0		0	
Control B	R1.2		0		0		0		0		0	
Control B	R2.1		0		0		0		0		0	
Control B	R2.2		0		0		0		0		0	
M1	R1.1	482	482	9	9	5	5	1	1	4	4	500
M1	R1.2		482		9		5		1		4	
M1	R2.1	468	468	14	14	6	6	6	6	7	7	500
M1	R2.2		468		14		6		6		7	
M2	R1.1	468	468	19	19	5	5	1	1	7	7	500
M2	R1.2		468		19		5		1		7	
M2	R2.1	463	463	27	27	4	4	4	4	2	2	500
M2	R2.2		463		27		4		4		2	
M3	R1.1	483	483	17	17	0	0	0	0	0	0	500
M3	R1.2		483		17		0		0		0	
M3	R2.1	489	489	11	11	0	0	0	0	0	0	500
M3	R2.2		489		11		0		0		0	
M4	R1.1	475	475	25	25	0	0	0	0	0	0	500
M4	R1.2		475		25		0		0		0	
M4	R2.1	478	478	23	23	0	0	0	0	0	0	500
M4	R2.2		478		23		0		0		0	

# BIOENSAYOS APLICADOS

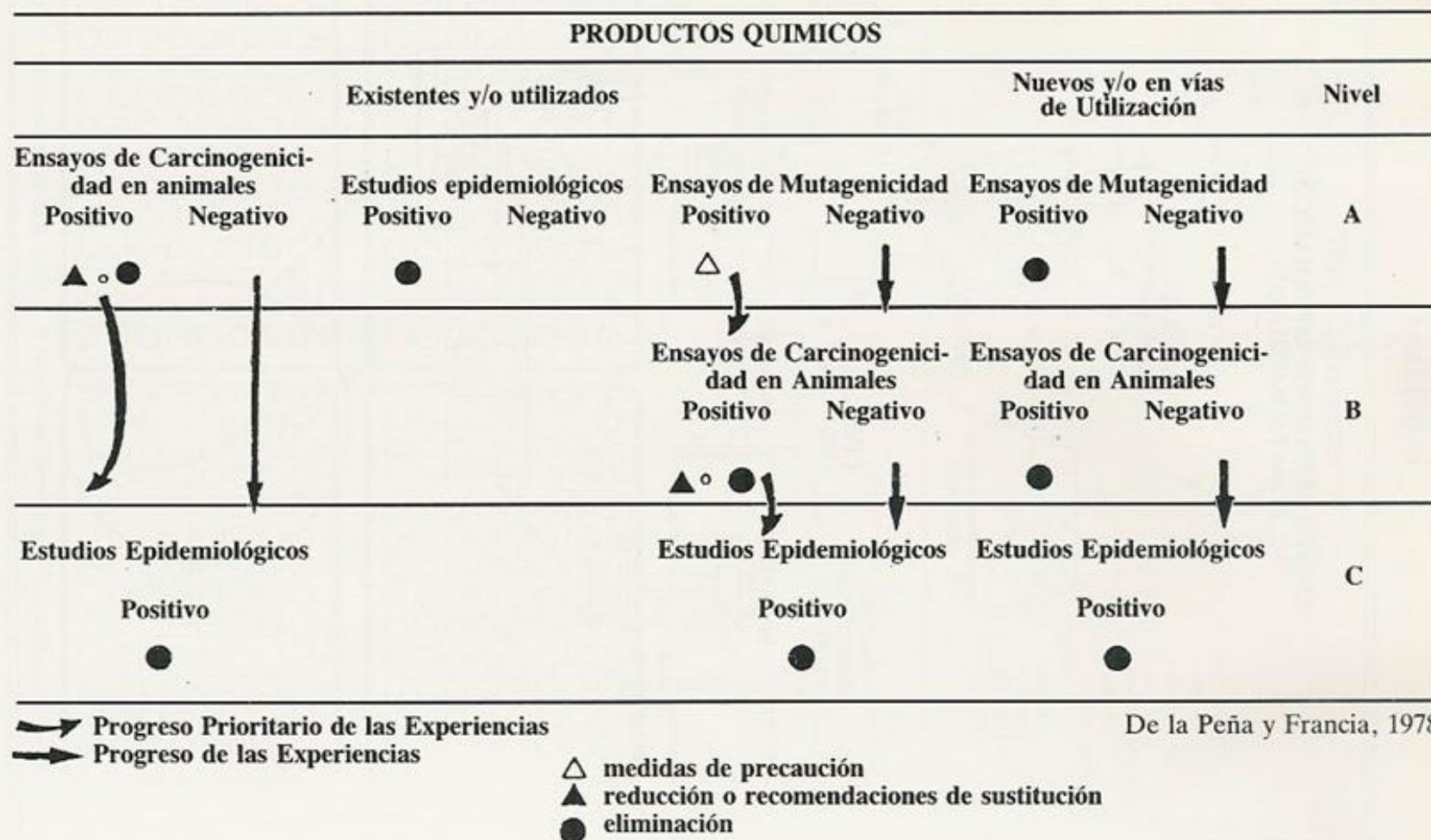
Ensayos Específicos				
Organismo de ensayo			Parámetro de expresión	
Levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Actividad endocrina	+ / -
Peces	<i>Oryzias latipes</i>		Anormalidades en desarrollo (Teratogenia)	CE50 NOEC y LOEC 15 días
Bacterias	<i>Salmonella typhimurium</i>		Acción mutagénica	+ / -
	<i>Vibrio fischeri</i>		Inhibición luminiscencia	CE50
Plantas	<i>Allium cepa</i>		Aberraciones cromosómicas	Índice mitótico 48 h Longitud raíces 72 h
	<i>Lepidum sativum</i>		% Germinación Longitud raíces	Germinación Longitud raíces 6 días

Es mejor *conocer* que un  
efecto tóxico **no existe**  
que *ignorar* que un efecto  
tóxico **no existe**

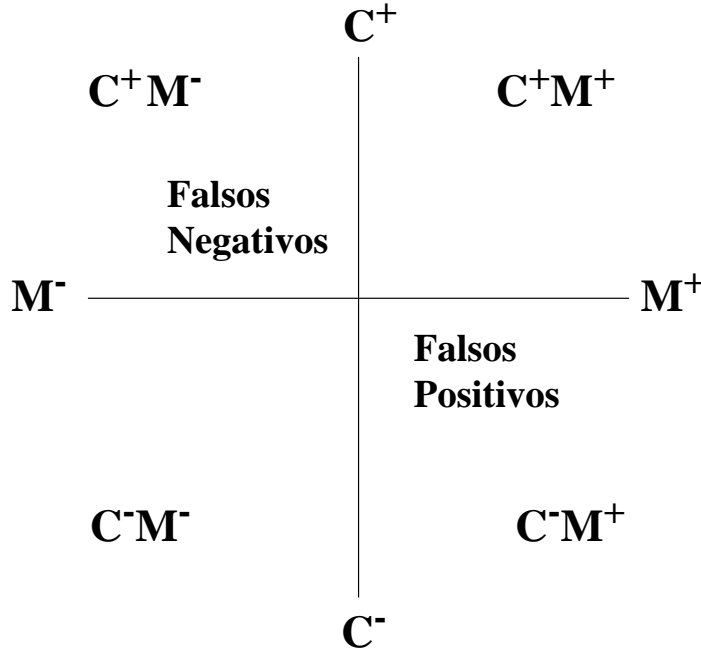


$C^+$  = CANCERÍGENOS  
 $C^-$  = NO CANCERÍGENOS  
 $M^+$  = MUTAGÉNICOS  
 $M^-$  = NO MUTAGÉNICOS

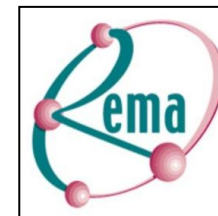
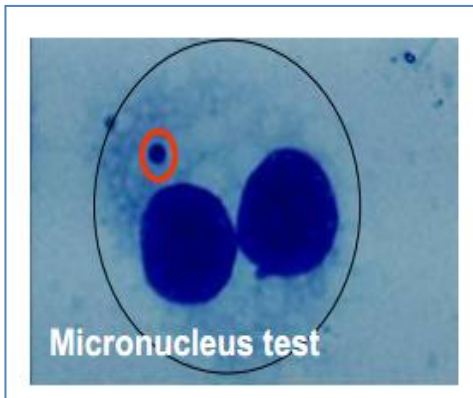
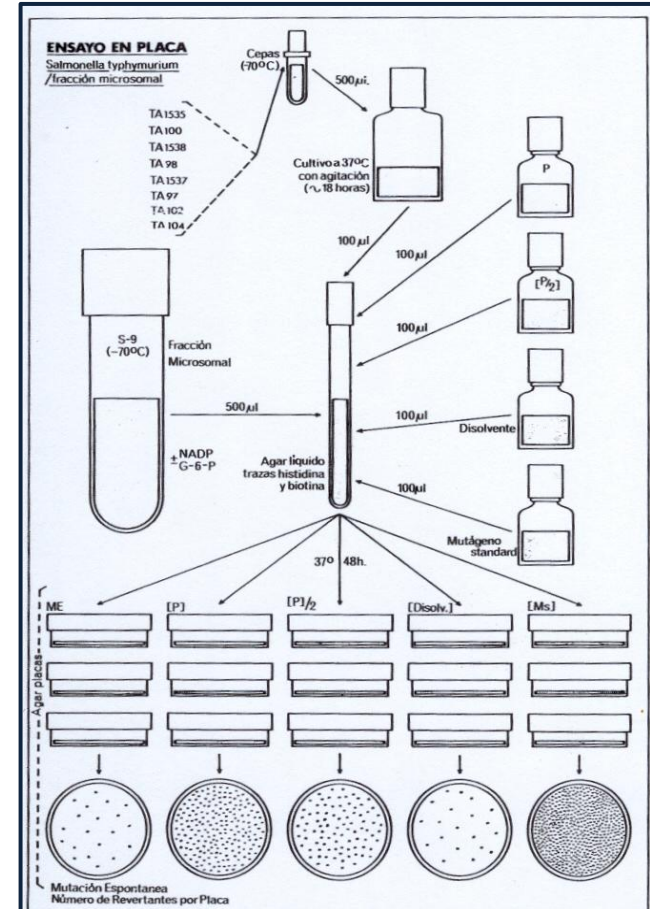
FIGURA 6. MEDIDAS A CONSIDERAR DE ACUERDO CON LAS EVIDENCIAS DEL RIESGO CARCINOGENICO DE LOS PRODUCTOS QUIMICOS PARA EL HOMBRE

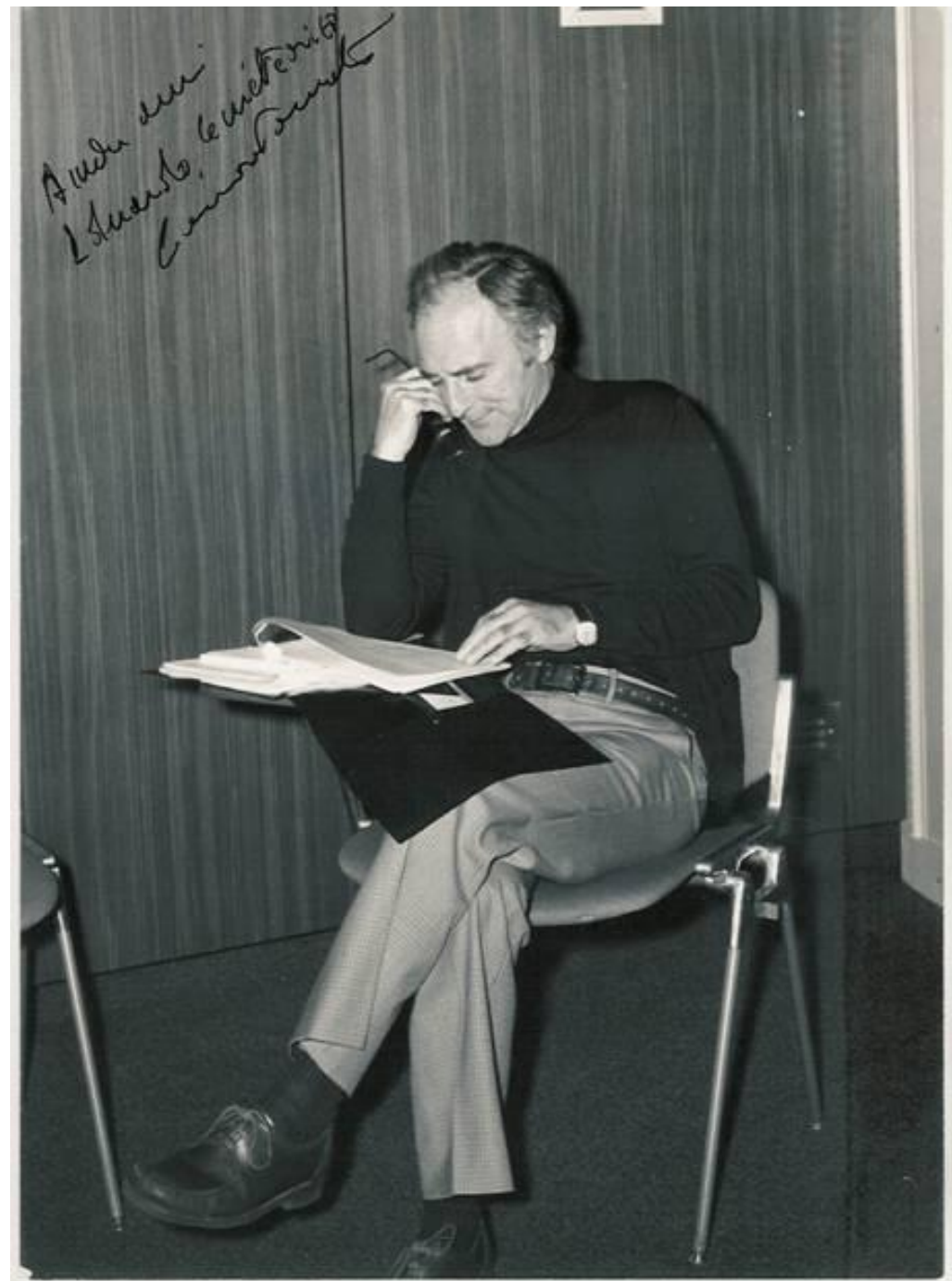
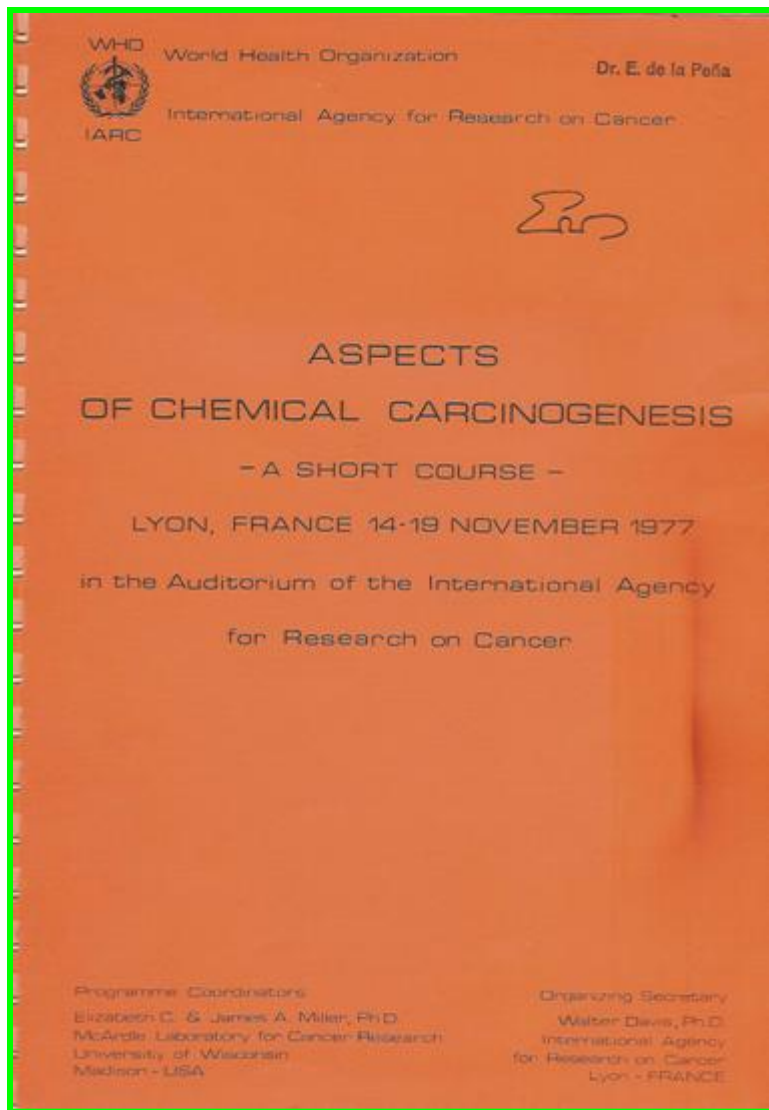


# Mutagenicidad / Carcinogenicidad



$C^+$  = CANCERÍGENOS  
 $C^-$  = NO CANCERÍGENOS  
 $M^+$  = MUTAGÉNICOS  
 $M^-$  = NO MUTAGÉNICOS





Programa desde 1971 de la  
Agencia Internacional para la  
Investigación del Cáncer  
Lyon. Francia **WHO – IARC**

1977

WORLD HEALTH  
ORGANIZATION



ORGANISATION MONDIALE  
DE LA SANTÉ

CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR LE CANCER  
INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER

150, COURS ALBERTI-THOMAS - 69372, LYON Cédex 2 - FRANCE  
Tel. (78) 75 81 81 - Télégr. Unicancer Lyon - Téléc. 380023 -

In reply please refer to : CHENCA/TST

Prise de rappeler la référence :

TO WHOM IT MAY CONCERN

Dr E. de la Peña de Torres spent a four month fellowship period in the Unit of Chemical Carcinogenesis of the IARC in 1977. During this period he carried out experimental work in the field of mutagenesis and chemical carcinogenesis with the specific aim of acquiring experience in methods related to the identification of environmental carcinogens.

I am pleased to acknowledge that Dr de la Peña de Torres has proved to possess a good theoretical background, an excellent technical ability and the capacity of rapidly understanding and mastering new laboratory techniques.

Furthermore, with the assistance of several members of our staff, he developed a plan for the establishment of a programme on the study of chemical carcinogenesis in Spain. This programme, aimed at providing useful data on which to base the implementation of primary prevention of cancer in humans, is based on the collection, retrieval and dissemination of existing information, as well as on the initiation of experimental studies of importance to the specific situation in his country. The programme is well conceived and takes into consideration a multidisciplinary approach to the prevention of cancer. As outlined, the project may have to be started on a limited scale, but should be expanded considerably in the future.

L. Tomatis, M.D.  
Chief  
Unit of Chemical Carcinogenesis

18 November 1977



2007



Programa desde 1971 de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Lyon. Francia **WHO – IARC**

International Agency for Research on Cancer

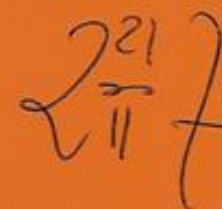


IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans

AGENTS CLASSIFIED BY THE IARC MONOGRAPHS, VOLUMES 109

Group 1	<i>Carcinogenic to humans</i>	113 agents
Group 2A	<i>Probably carcinogenic to humans</i>	66
Group 2B	<i>Possibly carcinogenic to humans</i>	285
Group 3	<i>Not classifiable as to its carcinogenicity to humans</i>	505
Group 4	<i>Probably not carcinogenic to humans</i>	1

WORLD HEALTH ORGANIZATION  
INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER



*IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*

VOLUME 88

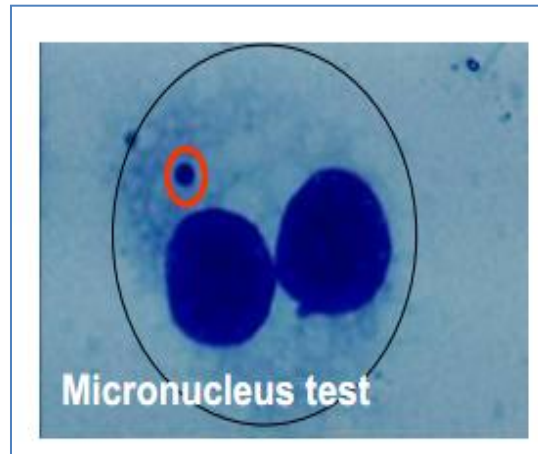
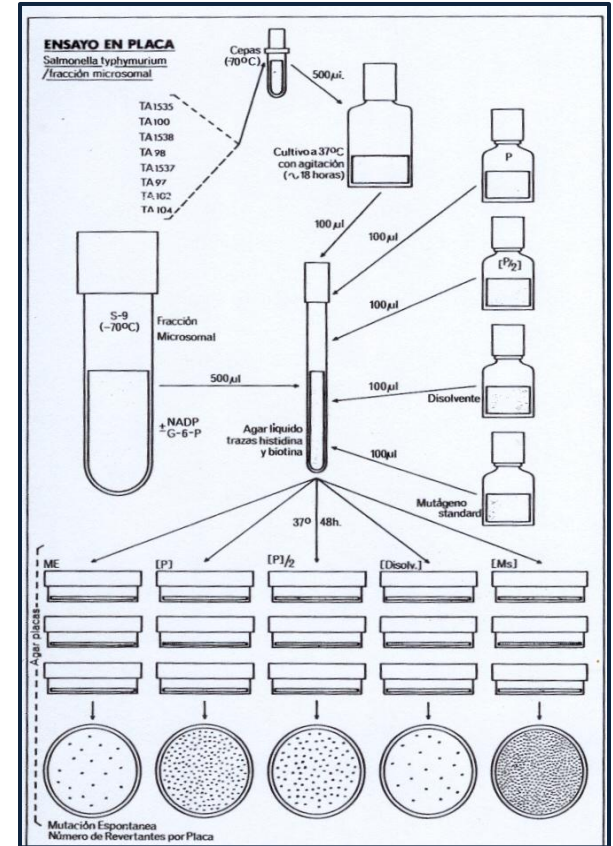
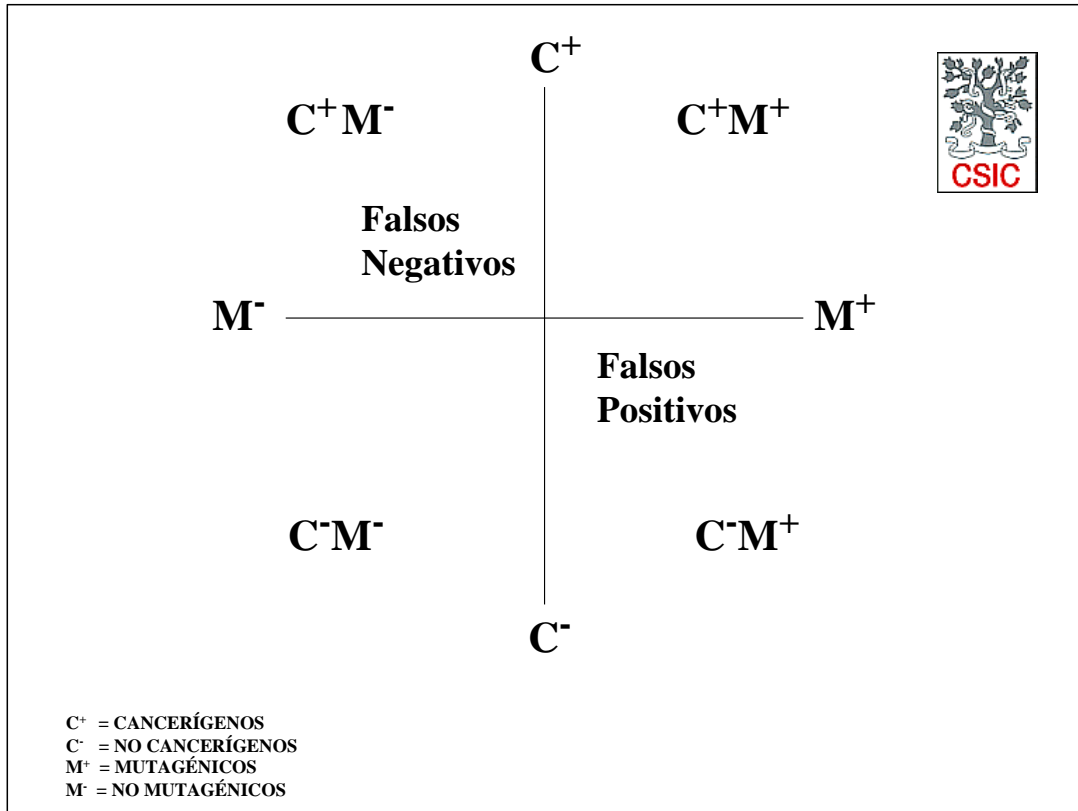
**Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol**



LYON, FRANCE  
2006



# Mutagenicidad / Carcinogenicidad



es mejor ***conocer*** que un  
efecto tóxico **no existe**  
que ***ignorar*** que un efecto  
tóxico **no existe**



## *Grupo de Mutagenesis Ambiental*

ICA - Centro de Ciencias Medioambientales  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Evaluación **genotóxica** de productos químicos naturales y sintéticos, residuos orgánicos, contaminantes mediante ensayos de corta duración utilizando **sistemas bacterianos** (*Salmonella/microsoma*) y cultivos *in vitro* e *in vivo* de **células vegetales** (*Allium cepa*) y **células de mamífero** (linfocitos de sangre periférica humana, CHO).

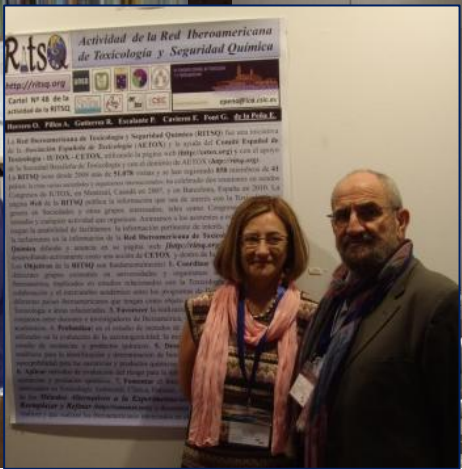
Ensayos *in vitro* e *in vivo* integrados en el desarrollo y validación de métodos complementarios alternativos a la experimentación animal.

Dr. Eduardo de la Peña de Torres. Investigador del CSIC  
Da. Antonia Martínez López

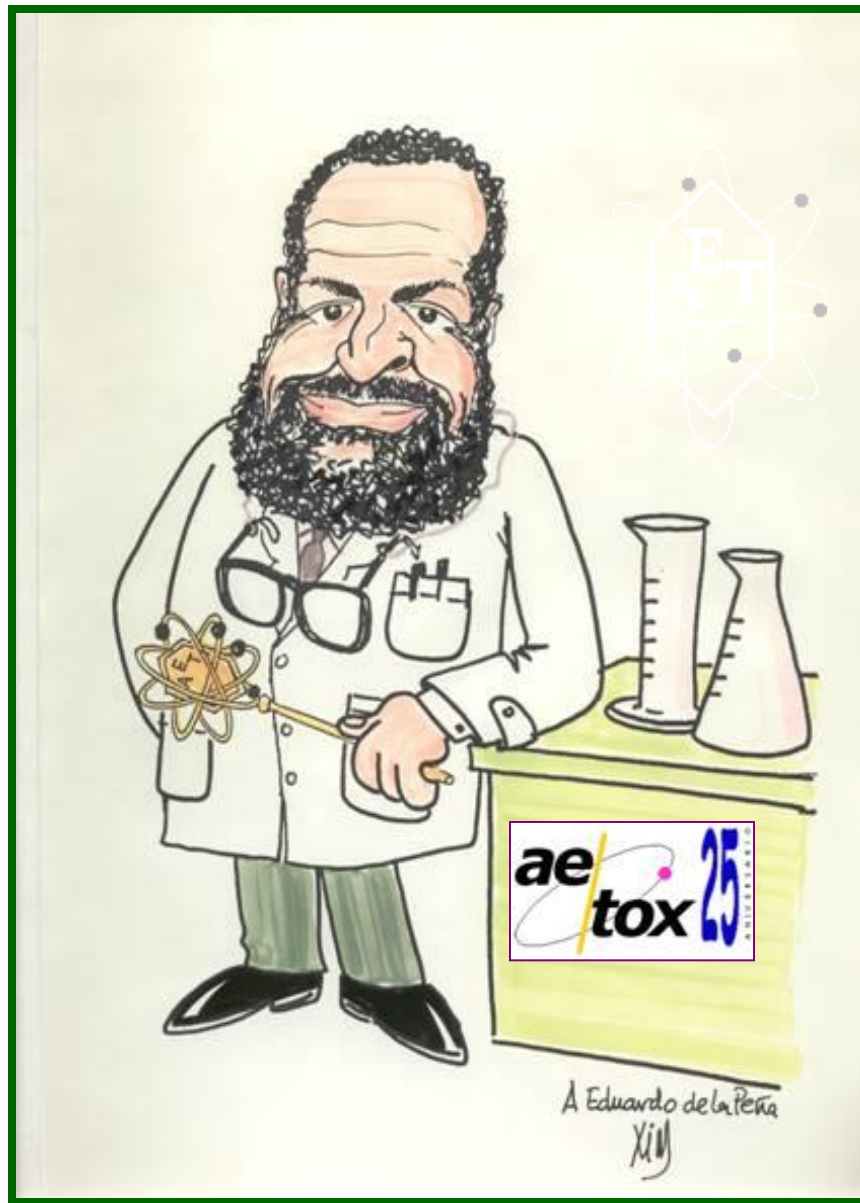
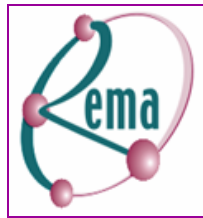
[epena@ica.csic.es](mailto:epena@ica.csic.es)

Mi sincero agradecimiento a las personas que han trabajado en nuestro Laboratorio\* o colaborando + enn nuestra actividades:

- \* **Dra. Araceli Pillco de Bolivia** (2009 -2011),
- \* **Master Irania Velazquez, Labiofarm Cuba**
- + **Dra. Fernanda Cavieres, Univ. Valparaíso. Chile**
- + **Dra. Rita Gutierrez, de México**
- + **Dra. Silvia Bechara de Colombia**
- + **Dra. Guillermina Font, Universidad de Valencia**
- \* **Da. Antonia Martínez Colaboradora del CSIC**



Trabajaron en el Grupo de Mutagenésis Ambiental, para la realización de sus Tesis Doctorales:  
**Dra. Carmen Barrueco, Dra. Carmen Canga**  
**Dr. Pedro Gutierrez, Dra. Angustias Herrera,**  
**Dra. Victoria Castaño y Dra. Elna Valcarce.**

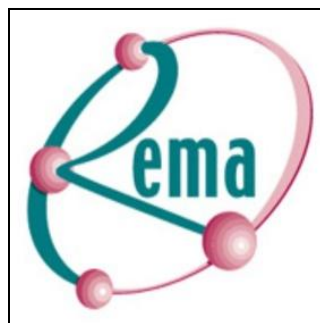


**Gracias por vuestra atención**

[epena@ica.csic.es](mailto:epena@ica.csic.es)



[www.aetox.es](http://www.aetox.es)



[www.remanet.net](http://www.remanet.net)



[www.sanidadambiental.com](http://www.sanidadambiental.com)



[www.us.es/sema](http://www.us.es/sema)



<http://csic.es>

Red Iberoamericana de  
Toxicología y Seguridad Química



<http://ritsq.org>

[epena@ica.csic.es](mailto:epena@ica.csic.es)