Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 35 Número 1 (2018) **SEMESTRAL**

INDEX

EDITORIAL 1

Carballo D., Pinheiro-Fernandes-Vieira P., Tolosa J., Font G., Berrada H., Ferrer E. **Dietary exposure to mycotoxins through fruits juice consumption** 2

Alonso Marín J, Castañeda Arango C, Palomino Camargo L, Pérez Agudelo JJ, Castro Álvarez JF. **Clinical Case Report: Neuroleptic malignant syndrome associated with the administration of haloperidol**..... 7

Avila Carreras NME., Bovi Mitre MG. **Bioavailability of arsenic and intake calculations in diets consumed by an endemic population of Taco Pozo. Comparison between infant and adult intakes**..... 11

Costero AM., González A.,Ortuño MA, Benavent A., Añón E. **Evaluation of reflux in intravenous delivery systems for hazardous drugs. Exposure of the nursing.**..... 18

García, K.Y., Salazar, M., García, J.E **Effect of neonicotinoid - thiamethoxam in the zebrafish *(Danio rerio)* embryonic development.**.....22

Castro, B.V; Escalera, A.R; Romero, A.E; Ávila Carreras, N.M.E. **Calculation of caffeine intake in students of school and higher education in San Salvador de Jujuy, Argentina.**..... 28

Escobar Toledo I.E., Berrouet Mejía M.C., Quevedo Vélez A. **Mercury steam toxicity in a nursling: case report**.....33

Fernández-Quintana A., Miguel-Arias D., Pereiro-Gómez C. **Relationship between overdosing and suicidal intent among deaths due to acute adverse drug reactions**.....37

Reig-Otero Y., Mañes Vinuesa J., Manyes i Font L. **Analysis of Amylase/Trypsin's Inhibitors contained in wheat and other cereals: potential promoters of intestinal inflammation.**..... 45

Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2018..... 53

Proceedings of the Spanish and Ibero-AMERICAN Workshop of Toxicology 2018..... 61

ÍNDICE

EDITORIAL..... 1

Carballo D., Pinheiro-Fernandes-Vieira P., Tolosa J., Font G., Berrada H., Ferrer E. **Exposición a micotoxinas a través del consumo de zumo de frutas**.2

Alonso Marín J, Castañeda Arango C, Palomino Camargo L, Pérez Agudelo JJ, Castro Álvarez JF. **Síndrome neuroléptico maligno asociado a la administración del haloperidol. Caso clínico.**..... 7

Avila Carreras, NME, Bovi Mitre, MG. **Bioaccesibilidad de arsénico y cálculos de ingestas en dietas consumidas por una población endémica de Taco Pozo. Comparación entre las ingestas infantiles y adultas**..... 11

Costero AM., González A.,Ortuño MA, Benavent A., Añón E. **Evaluación del reflujo en los sistemas de administración intravenosa de MP. Exposición del personal de enfermería**.....18

García, K.Y., Salazar, M., García, J.E. **Efecto del neonicotinoide - tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)**.....22

Castro, B.V; Escalera, A.R; Romero, A.E; Ávila Carreras, N.M.E. **Cálculo de ingesta de cafeína en estudiantes de etapa escolar y de educación superior de San Salvador de Jujuy, Argentina** 28

Escobar Toledo I.E., Berrouet Mejía M.C., Quevedo Vélez A. **Toxicidad asociada a vapores de mercurio en una lactante: a propósito de un caso**.....33

Fernández-Quintana A., Miguel-Arias D., Pereiro-Gómez C. **Relación entre sobredosis y suicidio en las muertes asociadas al consumo de drogas**..... 37

Reig-Otero Y., Mañes Vinuesa J., Manyes i Font L. **Análisis de los inhibidores de las α-amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal.**.....45

Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2018..... 53

Actas de las Jornadas de Toxicología Españolas e Iberoamericanas 2018..... 61

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Indexed in Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/Excerpta Medica and Chemical Abstracts

Certificado de Excelencia (2016-2019)

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 35 (1), 1 – 82 (2018)
ISSN 0212-7113

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGIA

La **Revista de Toxicología** de la Asociación Española de Toxicología tiene el objetivo de publicar información actualizada sobre investigaciones originales en Toxicología en castellano o en inglés y revisada por pares. Se publican artículos experimentales y de revisión de cualquier especialidad de la Toxicología, como Toxicología Alimentaria, Ambiental, Clínica, Forense, Veterinaria, Experimental y Métodos Alternativos así como en Educación en Toxicología. La revista aborda los aspectos de desarrollo y validación de nuevos métodos incluyendo estudios *in vivo* y estudios *in vitro*. Se publican así mismo las actas de congresos de la Asociación Española de Toxicología y Jornadas de Toxicología. El alcance de la revista abarca desde mecanismos moleculares y celulares hasta las consideraciones de las evidencias experimentales para la evaluación de riesgos.
Es una revista electrónica diseñada para facilitar la divulgación de la investigación actual en el campo de la Toxicología.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Resumen actual de características y normativas
El objetivo fundamental de la Asociación Española de Toxicología es el de propiciar la relación y cooperación entre sus miembros, y coordinar sus esfuerzos a fin de contribuir al desarrollo y difusión de los conocimientos en las diferentes áreas de la toxicología. Su Estatuto fundacional fue aprobado oficialmente el 15 de enero de 1980.
Toda persona interesada en pertenecer a esta Asociación deberá cumplimentar una ficha de inscripción, refrendada por la Junta Directiva. La cuota anual (60 €) se abona por domiciliación bancaria, Esta cuota da derecho a la recepción de la Revista de Toxicología cuando se publique una versión impresa, y a la reducción de la cuota de inscripción en los congresos y jornadas organizados por la asociación. Una vez admitidos los nuevos asociados recibirán un titulo y, periódicamente, las actas de las reuniones y comunicación de actividades con carácter nacional e internacional que pueden ser de interés.
La asociación promueve la celebración, cada dos años, del Congreso Español de Toxicología, cuya organización puede delegar. Además se ha establecido la celebración periódica de seminarios o mesas redondas organizadas por grupos de trabajo. Cada reunión de este tipo será monotemática y abierta a personas no pertenecientes a la Asociación, y se desarrollará en diferentes ciudades españolas.

Asociación Española de Toxicología

Secretaría de la AETOX
Emma Martín López Área de Toxicología
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
Tel: 86888 7022/9311 e-mail: emmaml@um.es

Copyright

El envío de un manuscrito implica: que no ha sido publicado anteriormente (excepto como abstract, o como parte de una conferencia o tesis); que no está considerándose su publicación en otra revista, libro, etc.; que su publicación ha sido aprobada por todos los coautores, si los hay; que, cuando y si el manuscrito es aceptado para su publicación, los autores están de acuerdo en la cesión automática del Copyright a la editorial y que el manuscrito no será publicado en ninguna otra parte ni en ningún otro idioma sin permiso de la editorial.

Todos los artículos publicados en esta revista están protegidos por Copyright, que cubre los derechos exclusivos de reproducción y distribución del artículo (p. ej. como separatas) y también los derechos de traducción, Ningún contenido de la revista puede ser reproducido, fotocopiado, microfilmado o almacenado en bases de datos electrónicas, videodiscos, etc., sin el permiso escrito de los titulares del Copyright.

El uso de nombres descriptivos, de marcas, marcas registradas, etc., incluso si no se identifican especialmente, no implica que estos nombres no estén protegidos por las leyes y regulaciones correspondientes.

Los trabajos se enviarán a través de la plataforma de la revista: ***http://revista.aetox.es***

El Equipo Editorial: revista@aetox.es

Editora:
Dra. Guillermina Font Pérez. Universitat de València.
Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal.
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Valencia

Editores adjuntos:
Dra. Emilia Ferrer García. Universitat de València
Dra. María P. Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura
Dr. Juan Carlos Rios Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile

D.L.: C0-723-83.
S.V.: 91051 R.
ISSN: 0212-7113

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/ Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 35 Número 1 (2018) **SEMESTRAL**

INDEX

EDITORIAL 1

Carballo D., Pinheiro-Fernandes-Vieira P., Tolosa J., Font G., Berrada H., Ferrer E. **Dietary exposure to mycotoxins through fruits juice consumption** 2

Alonso Marín J, Castañeda Arango C, Palomino Camargo L, Pérez Agudelo JJ, Castro Álvarez JF. **Clinical Case Report: Neuroleptic malignant syndrome associated with the administration of haloperidol**..... 7

Avila Carreras NME., Bovi Mitre MG. **Bioavailability of arsenic and intake calculations in diets consumed by an endemic population of Taco Pozo. Comparison between infant and adult intakes**..... 11

Costero AM., González A.,Ortuño MA, Benavent A., Añón E. **Evaluation of reflux in intravenous delivery systems for hazardous drugs. Exposure of the nursing.**..... 18

García, K.Y., Salazar, M., García, J.E **Effect of neonicotinoid - thiamethoxam in the zebrafish *(Danio rerio)* embryonic development.**.....22

Castro, B.V; Escalera, A.R; Romero, A.E; Ávila Carreras, N.M.E. **Calculation of caffeine intake in students of school and higher education in San Salvador de Jujuy, Argentina.**..... 28

Escobar Toledo I.E., Berrouet Mejía M.C., Quevedo Vélez A. **Mercury steam toxicity in a nursling: case report**.....33

Fernández-Quintana A., Miguel-Arias D., Pereiro-Gómez C. **Relationship between overdosing and suicidal intent among deaths due to acute adverse drug reactions**.....37

Reig-Otero Y., Mañes Vinuesa J., Manyes i Font L. **Analysis of Amylase/Trypsin's Inhibitors contained in wheat and other cereals: potential promoters of intestinal inflammation.**..... 45

Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2018..... 53

Proceedings of the Spanish and Ibero-AMERICAN Workshop of Toxicology 2018..... 61

ÍNDICE

EDITORIAL..... 1

Carballo D., Pinheiro-Fernandes-Vieira P., Tolosa J., Font G., Berrada H., Ferrer E. **Exposición a micotoxinas a través del consumo de zumo de frutas**.2

Alonso Marín J, Castañeda Arango C, Palomino Camargo L, Pérez Agudelo JJ, Castro Álvarez JF. **Síndrome neuroléptico maligno asociado a la administración del haloperidol. Caso clínico.**..... 7

Avila Carreras, NME, Bovi Mitre, MG. **Bioaccesibilidad de arsénico y cálculos de ingestas en dietas consumidas por una población endémica de Taco Pozo. Comparación entre las ingestas infantiles y adultas**..... 11

Costero AM., González A.,Ortuño MA, Benavent A., Añón E. **Evaluación del reflujo en los sistemas de administración intravenosa de MP. Exposición del personal de enfermería**.....18

García, K.Y., Salazar, M., García, J.E. **Efecto del neonicotinoide - tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)**.....22

Castro, B.V; Escalera, A.R; Romero, A.E; Ávila Carreras, N.M.E. **Cálculo de ingesta de cafeína en estudiantes de etapa escolar y de educación superior de San Salvador de Jujuy, Argentina** 28

Escobar Toledo I.E., Berrouet Mejía M.C., Quevedo Vélez A. **Toxicidad asociada a vapores de mercurio en una lactante: a propósito de un caso**.....33

Fernández-Quintana A., Miguel-Arias D., Pereiro-Gómez C. **Relación entre sobredosis y suicidio en las muertes asociadas al consumo de drogas**..... 37

Reig-Otero Y., Mañes Vinuesa J., Manyes i Font L. **Análisis de los inhibidores de las α-amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal.**.....45

Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2018..... 53

Actas de las Jornadas de Toxicología Españolas e Iberoamericanas 2018..... 61

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 35 (1), 1 – 82 (2018)
ISSN 0212-7113

Calidad de Revistas Científicas Españolas FECYT | FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA | 2016

Certificado de Excelencia (2016-2019)

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ DE REDACCIÓN

Editora
Dra. GUILLERMINA FONT PÉREZ
Universitat de València. VALENCIA

Editores Adjuntos
Dra. EMILIA FERRER GARCÍA
Universitat de València. VALENCIA

Dra. Mª DEL PRADO MÍGUEZ SANTIYÁN
Universidad de Extremadura. CÁCERES

Dr. JUAN CARLOS RÍOS BUSTAMANTE
Pontificia Universidad Católica. CHILE

Comité Editorial

DR. RAFAEL BALAÑA
Universidad de León. LEON

DRA. ANA MARIA BERMEJO.
Universidad de Santiago de Compostela. LA CORUÑA

Dra. HOUDA BERRADA RAMDAMI
Universitat de València. VALENCIA

Dra. ANA MARÍA CAMEÁN FERNÁNDEZ
Universidad de Sevilla. SEVILLA

DRA. MÓNICA FERNÁNDEZ FRANZÓN
Universitat de València.VALENCIA

Dr. FERNANDO GIL HERNÁNDEZ
Universidad de Granada. GRANADA

DR. DAVID HERNÁNDEZ MORENO
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria. MADRID

Dra. ÁNGELES JOS GALLEGO
Universidad de Sevilla. SEVILLA

Dra. Mª ARÁNZAZU MARTÍNEZ CABALLERO
Universidad Complutense de Madrid. MADRID

Dra. EMMA MARTÍNEZ LÓPEZ
Universidad de Murcia. MURCIA

DRA. ANA MARÍA MOLINA LÓPEZ
Universidad de Córdoba. CÓRDOBA

DRA. ANA ISABEL MORALES.
Universidad de Salamanca. SALAMANCA

DRA. ROSARIO MOYANO SALVAGO
Universidad de Córdoba. CÓRDOBA

DR. MARCOS PÉREZ LÓPEZ
Universidad de Extremadura. CÁCERES

DRA.SILVIA PICHARDO SÁNCHEZ
Universidad de Sevilla. SEVILLA

DRA. ANA ISABEL PRIETO ORTEGA
Universidad de Sevilla. SEVILLA

Dra. MARÍA JOSÉ RUIZ LEAL
Universitat de València. VALENCIA

DR. FRANCISCO SOLER RODRÍGUEZ
Universidad de Extremadura. CÁCERES

Dra. MARÍA JESÚS TABERNERO DUQUE
Universidad de Santiago de Compostela. LA CORUÑA

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/ Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Revista de Toxicología

EDITORIAL

Estimadas y estimados colegas, el equipo editorial continúa con gran ilusión trabajando en la Revista de Toxicología.

Deseamos de nuevo agradecer a todas las personas que han hecho posible su publicación. A los autores que han confiado en nuestra Revista de Toxicología para publicar sus resultados y a los revisores que con su colaboración desinteresada ponen su saber para que los artículos sean científicamente revisados.

En este número se publican artículos de Argentina, Brasil, Colombia, España y Paraguay. Es para nosotros una satisfacción y orgullo el interés de nuestros colegas de Iberoamérica respecto a la Revista de Toxicología.

Queremos recordaros que los artículos de la Revista de Toxicología, una vez aceptados se encuentran disponibles con posibilidad de ser citados, y se pueden consultar en la página de la Revista, aunque no esté publicado el número completo.

Así mismo, es conveniente citar los artículos de la Revista, pues este hecho contribuirá a dar visibilidad al trabajo realizado por los toxicólogos y las toxicólogas. Y, como no, animaros a publicar en la Revista de Toxicología.

Un cordial saludo a tod@s

Equipo Editorial

Rev. Toxicol (2018) 35: 2 - 6

Dietary exposure to mycotoxins through fruits juice consumption

Carballo D.[1], Pinheiro-Fernandes-Vieira P.,[2], Font G.,[3] Berrada H.,[3], Ferrer E.,[3 *]*

[1] *Faculty of Agricultural Science, National University of Asunción, Paraguay*
[2]*Department of Gastronomy, Center for Regional Development, Federal University of Paraíba- Brazil*
[3]*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenue Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Spain.*

Abstract: A study on fruit juice products (apple, pineapple, apricot, orange and pear) was carried out to determine the natural occurrence of fifteen mycotoxins by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). A developed multi-mycotoxin procedure was carried out by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). 36% of the analyzed samples presented mycotoxin contamination. PAT was detected in orange, apple, mixed fruits and pineapple juices with prevalence of 86%, 60%, 29%, 14% at mean concentrations of 34.57 µg/L, 33.41 µg/L, 8.59 µg/L, 8.02 µg/L, respectively. One orange juice sample, exceeded the maximum level (ML) established by EU for PAT (50 µg/L). HT-2 toxin was found in mixed juice (43%) at mean level of 22.38 µg/L. Overall no toxicological concern was associated to mycotoxins exposure for children and adult population and the results obtained highlight the necessity for rigorous monitoring studies on HT-2 in fruit juice.

Keywords: mycotoxins, fruit juice, daily intake

Resumen: Exposición a micotoxinas a través del consumo de zumo de frutas.

Se presenta un estudio sobre zumos de frutas a base de manzana, piña, albaricoque, naranja y pera para determinar la presencia natural de quince micotoxinas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (EM/EM). El procedimiento desarrollado de multi-micotoxinas se llevó a cabo mediante micro-extracción líquida-líquida dispersiva (DLLME). El 36% de las muestras analizadas presentaron contaminación con micotoxinas y una muestra de jugo de naranja, superó el nivel máximo (ML) establecido por la UE para PAT (50 µg/L). Se detectó PAT en naranja, manzana, frutas mezcladas y jugos de piña con una prevalencia de 86%, 60%, 29%, 14% a concentraciones promedio de 34.57 µg/L, 33.41 µg/L, 8.59 µg/L, 8.02 µg/L, respectivamente. La toxina HT-2 estaba presente en el jugo mixto (43%) a un nivel medio de 22.38 µg/L. En general, ninguna preocupación toxicológica se asoció con la exposición a micotoxinas en la población de niños y adultos, los resultados ponen de relieve la necesidad de estudios rigurosos de monitoreo de HT-2 en el zumo de fruta.

Palabras claves: micotoxinas, zumos de frutas, ingesta diaria

Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi as *Aspergillus, Penicillium, Fusarium and Claviceps.* More than 400 mycotoxins are known and only some of them represent a real threat to food security. The most relevant are aflatoxins (AFs), ochratoxin A (OTA), Patulin (PAT) fumonisins (FBs), zearalenone (ZEA) and trichothecenes (TCs) [1]. Chronic exposition to some mycotoxins can produce carcinogenic, mutagenic, teratogenic, cytotoxic, neurotoxic, nephrotoxic, immunosuppressive and estrogenic effect. Their seriousness effects depend largely on the ingested amounts and duration of exposure that may result from simultaneous ingestion of various mycotoxins [2]. Mycotoxins can be present along the entire process of food production; in field, before and after the harvest, during processing, storage and also in a finished product [3].

Various factors affect the levels of contamination of mycotoxins in fruit and fruit products such as type and variety of fruit, climate conditions, geographical location, year production treatments before and after the harvest, use and pesticides, damage to the surface of the fruit, and storage conditions [4]. European Food Safety Authority (EFSA) have established maximum permitted levels for certain mycotoxins as aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2 y M_1, OTA, PAT, ZEA, DON and fumonisins B_1 and B_2, T-2 and HT-2 toxins [5]. In fruits and fruit juices, only PAT and OTA are legislated. A maximum up to 50 µg/kg is set for Patulin in reconstituted concentrated fruit juices and fruit nectar (Table1)

Table 1. *Summary of maximum levels specified for patulin in fruit and fruit juice*

Food products	Maximum level µg/kg
Fruit juices, concentrated fruit juices as reconstituted and fruit, nectars, spirit drinks, cider and other fermented drinks derived from apples or containing apple juice	50
Apple juice and solid apple products	10

While for Ochratoxin A a maximum level of 2 µg/kg is set up in grape juices, reconstituted concentrated grape juice, grape nectar, grape must and reconstituted concentrated grape must, intended for direct human consumption [5].

The presence of mycotoxins has been highly investigated in different fruit juices such as apple juice [6], orange juice [7], pear juice [8] apricot and peach juice [9] and berry juice [10]. The most of the method used for extraction mycotoxins in fruit juice are QuEChERS extraction [11], liquid-liquid extraction [12], and dispersive liquid-liquid microextraction [13]. DLLME offers some advantages over traditional technique being simple, fast and low cost technique extraction [14].

Regarding analytical method for mycotoxins determination, liquid chromatography mass spectrometry in tandem (LC-MS/MS) and gas chromatography coupled to mass spectrometry detector (GC-MS/MS) have become the most extensively technique used for determination of mycotoxins in biological and food samples [15, 16]. The gas chromatographic techniques offers some advantages as lower detection limits and greater selectivity [17].

In this sense the aim of the present study was to evaluate the presence of fifteen mycotoxins DON, 3-AcDON, 15-AcDON, NEO, DAS, NIV, ZON, α-ZOL, β-ZOL,α-ZAL, β-ZAL, FUS X, T-2, HT-2 and PAT and to carry a risk exposure of the population to these mycotoxins through the fruit juice consumption.

Material and methods

Chemicals and reagents

Solvents (acetonitrile, hexane, chloroform and methanol) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Deionized water (<18.2 MΩ cm resistivity) was obtained in the laboratory using a Milli-QSP® Reagent Water System (Millipore, Beadford, MA, USA).

Ammonium formate (99%) and formic acid (≥98%), sodium chloride were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Syringe nylon filter (13mm diameter 0.22 µm pore size) were obtained from Analysis Vinicos S.L. (Tomelloso Spain). The derivatization reagent composed of BSA (N,O-bis(trimethylsily) + TMCS (trimthylcholorosilane) + TMSI (N-trimethylsilyimidazole) (3:2:3) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA). Sodium dihydrogen phosphate and disodium phosphate, used to prepare phosphate buffer, were acquired from Panreac Quimica S.L.U. (Barcelona, Spain).

*e-mail: diocarve@alumni.uv.es

Standards and solutions

The standards of DON, 3-ADON, 15-ADON, DAS, NIV, FUS-X, NEO ZON, α-ZAL, β-ZAL, α-ZOL, β-ZOL, T-2 and HT-2 toxins were purchased from Sigma Aldrich. Individual stock of all analytes were prepared to obtain 20 mg/L in methanol and multianalyte working solutions of 2 mg/L were also used by diluting the individual stock solutions. The multianalyte working standard solution was used for standard calibration curves, matrix-matched calibration curves and recovery assays. All standards were stored in darkness and kept at-20°C.

Procedures

Commercial samples

A total of 42 samples were purchased from different supermarkets in Valencia, Spain. The samples were classified in as 10 samples of apple juice, 7 samples of each of pineapple, apricot, mixed fruits and orange juices and 4 samples of pear juice.

Dispersive liquid-liquid microextraction

Samples extraction was performed according to the previously validated method by Pallarés et al. [18]. Briefly, 5 mL aliquot of fruit juice sample were placed in a 10 mL conical tube, a mixture of dispersion solvent (950 µL of ACN) and the extraction solvent (620 µL of EtOAc) were added; the resulting mixture was shaken for 1 min, forming a cloudy solution of the three components. The mixture was centrifuged 4000 rpm for 5 min, and the organic phase at the top of the tube was recovered and placed in second conical tube. Next, a mixture of dispersion solvent (950 µL of MeOH) and extraction solvent (620 µL of CHCl3) was added to the remaining residue, and after agitation and centrifugation, the separated organic phase was recovered and added to the first organic phase. The solvent in the conical tube containing the two recovered phases was evaporated to near dryness under a nitrogen stream using turvovap LV Evaporator (Zimark, Hopkinton, MA). The residue was reconstituted with 1 mL of 20 mM ammonium formate (MeOH/ACN) (50/50 v/v) and filtrated through a 13-mm/0.22 µm nylon filter (Membrane Solutions, Plano, TX). Finally, reconstituted extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow.

Derivatization

Before GC-MS/MS analysis, 50 µL of BSA + TMCS + TMSI (3:2:3) was added to the dry extract and left 30 min at room temperature. Then 200 µL of hexane was added, mixed thoroughly on vortex for 30 s, washed with 1 ml of phosphate buffer (60 mM, pH7) and mixed until the upper layer was clear. Finally, the hexane layer was transferred to an auto sampler vial.

GC-MS/MS analysis

Gas chromatographic determination was carried out using a GC system Agilent 7890A coupled with an Agilent 7000A triple quadruple mass spectrometer with inter electron-impact ion source (EI, 70Ev) and Agilent 7693 auto sampler (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Quantitation data were acquired at selection reaction monitoring (SRM). The transfer line and source temperatures were 280° and 230°, respectively. The collision gas for MS/MS experiments was nitrogen, and the helium was used as quenching gas, both at 99.999% purity supplied by Carburos Metálicos S.L. (Barcelona, Spain). Analytes were separated on a HP-5MS 30m x 0.25mm x 0.25µm capillary column. A total one microliter of the final clean extract of mycotoxins was injected in splitless mode in programmable temperature vaporization (PTV) inlet at 250°C employing helium as the carried gas at fixed pressure of 20.3 psi. The oven temperature started at 80°C, and increased to 245°C at 60 ºC/min, hold their time for 3 min and increased to 260 ºC progressively at to 3 ºC/min and finally to 270 ºC at 10 ºC/min and then held for 10 min. Data were acquired and processed using Agilent Masshunter version B.04.00 software.

The criteria established in Document No. SANCO 11813/2017 [19] was achieved for quantification purposes. For each analyte, two transitions of SRM were required for each compound and compliance of the SRM ratio, defined as the relative intensities of ions between the area of both the quantitation (Q) and the confirmation transition (q). The most intense SRM transition was selected for quantification purposes. The specific parameters of MS/MS for each mycotoxin are detailed in table 2.

Table 2. *MS/MS parameters of the selected mycotoxins*

Mycotoxin	Retention time (min)	Quantitative Transition (Q)			Qualitative transition (q)		
		Q1	Q3	CE, eV (Dt, ms)	Q1	Q3	CE, eV (Dt, ms)
DON	8.4	392	259	10 (25)	407	197	10 (25)
3-ADON	9.68	392	287	5 (35)	467	147	10 (25)
15-ADON	9.65	392	217	20(35)	392	184	20(35)
NIV	10.15	289	73	15 (35)	379	73	15 (35)
NEO	11.68	252	195	10 (25)	252	167	15 (35)
DAS	9.85	350	229	15 (35)	378	124	10 (25)
HT-2	14.39	347	157	10 (25)	347	185	10 (25)
T-2	14.8	350	259	10 (25)	350	229	15 (35)
FUS-X	9.73	450	260	10 (35)	450	245	20 (35)
PAT	4.3	226	73	10 (50)	183	75	15 (50)
ZON	15.95	462	151	10 (25)	462	333	10 (25)
α-ZAL	15.45	433	309	20 (35)	433	295	20 (35)
ß-ZAL	15.68	433	295	15 (35)	307	73	10 (35)
α-ZOL	16.45	305	73	15 (25)	305	289	15 (20)
ß-ZOL	16.82	536	333	10 (35)	536	446	15 (20)

Exposure assessment

The probable daily intake (PDI) is considered one of the most important aspect for the measure and characterization of risk assessment of contaminants in food. With the aim of estimating exposure to the substance in the population [20], the probable daily intakes (PDIs) was calculated and expressed in µg/L bw day as indicated by the following equation:

PDI= (C*K)/bw

Where "C" is the mean concentration of mycotoxin detected in food expressed as µg/L. "K" represents fruit juice consumption expressed in L per day and "bw" is the average weight of the age groups studied. Fruit juice consumption data were available in the statistical data base of the Spanish Ministry of Agricultural and Environment (MAPAMA), considering a consumption of 10 L/annual [21]. As this fruit juice by general population including children, two different body weights were considered (25 kg and 70 kg for children and adults, respectively).

The health risk characterization of mycotoxin (%) percentage of relevant TDI) was performed by dividing the calculated PDI by the tolerable daily intake (TDI) (µg/kg bw day) of the respective mycotoxins.

%TDI= (PDI/TDI)*100

The established provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) for PAT of 400 ng/kg bw was established [22] and 60 ng/kg bw for the sum T-2 and HT-2 toxins [23].

Results and discussion

Method validation and analytical parameters

The analytical method was validated for fruit juice samples (Table 2). Matrix effects were corrected by matrix-assisted calibration curve a mycotoxin-free sample. For the evaluation of the linearity, calibration curves were constructed at eight concentration levels (250 to 1.97 µg/L for all studied analytes).

The results showed good correlation coefficients (r^2 >0.9986). Limits of detection (LODs) were calculated using a signal-to-noise of 3 (from 0.58 to 2.34 µg/L). Limit of quantification (LOQ) were calculated using a signal-to-noise of 10 (from 1.95 to 7.81 µg/L). The accuracy was evaluated through essays recoveries at three concentrations (50, 100, 200 µg/L). Intraday and interday precision of the method were carried out by spiking fruit juice at the three levels previously indicated was assessed based on three determination on the same day, and interday precision was assessed based on three determinations on consecutive. Method precision was estimated by calculating the relative standard deviation (RSD) using the results obtained during the same day (intraday) and on three different days (interday) by the repeated analysis three times at the three spiked levels. Recoveries values at three spiked levels were ranged from 61 to 114 %.

Natural occurrence of mycotoxin in fruit juice

A total de 42 different samples were evaluated. The results of the natural occurrence are shown in the table 3.

Table 3. *Analytical parameters for the used method: limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recovery, interday relative standard deviation (RSD_R) (n=9), absolute matrix effect, and linearity expressed as correlation coefficient (r^2)*

			Recovery (RSD_R) (%)							
Analyte	LOD µg/L	LOQ µg/L	50 µg/L		100 µg/L		200 µg/L		Matrix effect (%)	Linearity
DON	0.58	1.95	68	(3)	73	(4)	62	(3)	103	0.996
3ADON	1.17	3.90	103	(2)	103	(7)	105	(11)	88	0.991
15ADON	0.58	1.95	95	(7)	98	(1)	96	(7)	114	0.993
DAS	1.17	3.90	103	(1)	91	(7)	84	(9)	96	0.991
FUS-X	2.34	7.81	84	(9)	106	(9)	98	(4)	106	0.995
T-2	2.34	7.81	98	(3)	96	(12)	78	(12)	71	0.991
HT-2	0.58	1.95	106	(11)	107	(5)	97	(5)	78	0.991
NIV	1.17	3.90	61	(3)	88	(9)	97	(7)	87	0.995
NEO	0.58	1.95	105	(6)	114	(1)	90	(6)	95	0.991
PAT	2.34	7.81	61	(9)	96	(6)	92	(13)	78	0.998
ZON	2.34	7.81	98	(2)	113	(9)	103	(9)	115	0.991
AZAL	0.58	1.95	101	(10)	97	(4)	99	(3)	88	0.992
BZAL	2.34	7.81	97	(5)	1055	(8)	104	(4)	91	0.994
AZOL	0.58	1.95	80	(1)	113	(1)	95	(11)	62	0.992
BZOL	1.17	3.90	98	(4)	93	(3)	102	(6)	69	0.992

Occurrence of Patulin

Six apple juice samples (60%) presented patulin contamination at mean levels of 33.41 µg/L, which are above 10 µg/kg of ML established for apple juice. Orange juice samples also resulted contaminated by PAT in 86% of the sample with mean content of 31.29 µg/L, 29% of mixed juiced sample resulted contaminated by PAT, but only one sample of pineapple juice contained PAT at mean level of 8.05 µg/L.

Figure 1**.** MRM chromatogram of a) standard matrix matched with fruit juice at 125 µg/L of PAT and HT-2 toxin. b) positive orange juice sample containing 14.78 µg/L and positive mixed juice containing HT-2 toxin 21.38 µg/L.

Several studies reported presence of PAT in different types of fruit juice at highest concentrations to those found in this survey. In a recent study Li et al. [6] reported high concentration of PAT until 1234 µg/L in apple juice brand. The presence of PAT in orange juice also was reported in other study conducted by Cho et al. [24] who reported natural occurrence of PAT in orange juice in 8% of sample ranged between 9.9 to 30.9 µg/L. Regarding pineapple juice, similar incidence to those found in this study were reported by Lee et al. [25] who confirmed the presence of PAT in only one sample at concentration of 33.7 µg/L. Drusch and Ragab [26] confirmed in a published review presence of PAT in fruit juice sample that contain pineapple with a maximum concentration of 60 µg/L.

Occurrence of HT-2 toxins

HT-2 toxins were present in 43% of the mixed juice (apple, mango, pineapple) in ranging from 21.38 to 24.15 µg/L. The mycotoxins of the trichothecene group are generally present in grains and grain-based products and, as far as we know, very rarely in juices. However, López et al. [27] reported presence of T-2 toxins in apple juice composite at 14 µg/L and HT-2 toxins only was detected below LOQ (<20 µg/L). Those authors mentioned that cross contamination during manufacturing the preparation of compound may have caused the presence of T-2 in apple juice composite samples.

In this study mycotoxins were not found in apricot and pear juice samples. However Poapolathep et al. [28] has investigated PAT in 40 apricot juice sample, 10% of samples contained PAT at mean levels of 4.51 µg/L. Similar content were found by Sparado et al. [9] who quantified PAT in 29% of sample at mean concentration of 3.6 µg/L. Moukas et al., et al. [29] also reported PAT in apricot juice samples at mean level of 13.70 µg/L.

Concerning presence of mycotoxin in pear juice, Rahimi et al. [30]

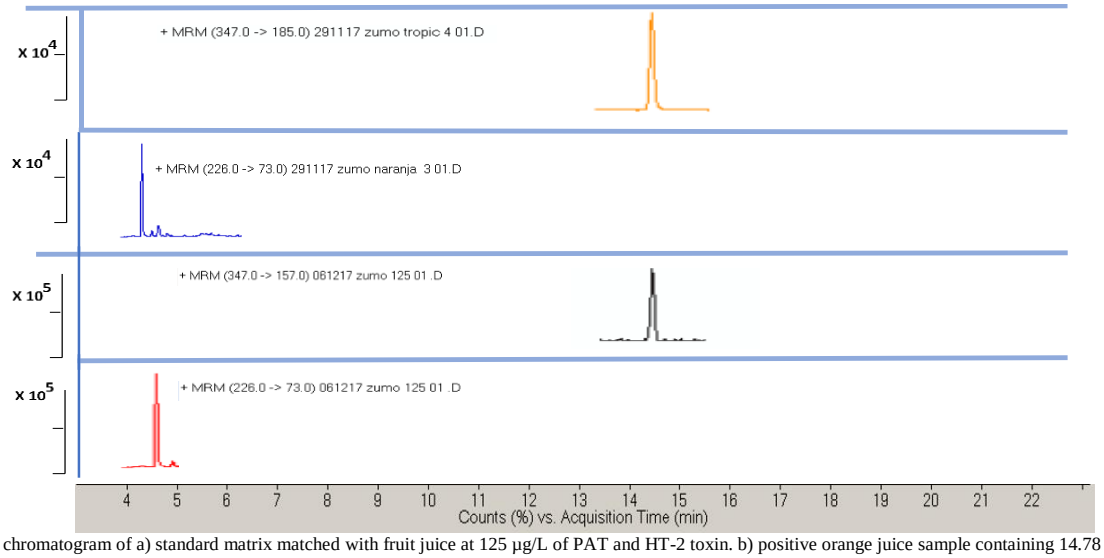

Figure 1: MRM chromatogram of a) standard matrix matched with fruit juice at 125 µg/L of PAT and HT-2 toxin. b) positive orange juice sample containing 14.78 µg/L and positive mixed juice containing HT-2 toxin 21.38 µg/L.

Table 4. *Occurrence of patulin and HT-2 in fruit juice analyzed*

Mycotoxin	Parameters	Apple	Pineapple	Orange	Mixed fruits	Apricot	Pear
PAT	Incidence	6/10	1/7	6/7	2/7	0/7	0/4
	Mean (µg/L)	33.41	8.05	34.57	8.59	-	-
	Range (µg/L)	28.07-47.82	8.05	14.78-50.95	6.3-10.89	n.d	n.d.
HT-2	Incidence	-	-	-	(3/7)	-	-
	Mean (µg/L)	n.d.	n.d.	n.d.	22.38	n.d	n.d
	Range (µg/L)	n.d.	n.d.	n.d.	21.38-24.15	n.d	n.d

analyzed 15 pear juice samples, but only two samples resulted contaminated by PAT at mean concentrations of 22.9 µg/L. Similar results were detected by Drush and Ragab [26] who also reported presence of PAT at maximal concentration of 20 µg/L. Highest content were reported by Zouaoui et al. [8] who detected PAT in in 47% of pear juice samples at average concentration of 62.5 µg/L. This value exceed ML established of PAT in fruit juice which it is 50 µg/kg.

Calculation PAT and HT-2 toxins intake

The PDI calculated values and comparison with the PMTDI for the risk assessment in children and adults population are reported in the Table 5. The PDI obtained for patulin in apple juice was 26.72 and 9.54 ng/kg bw day. The PDI calculated in orange juice were 27.65 and 8.94 ng/kg bw day. In pineapple juice was obtained PDI of 2.44 and 0.87 ng/kg bw day. PDI ranging from were 6.87 and 2.45 ng/kg bw day through the consumption mixed juice. The results indicated a low exposure to PAT through fruit juice consumption.

In others studies, estimate daily intake value calculated for PAT through the consumption of apple juice consumed in Spain ranged between 155 and 55 ng kg/bw day for children and adult, respectively [12]. EDI of PAT obtained by Poapolathep et al. [28] for the children Thailand population through the consumption of apple juice were 0.96 µg/kg bw day.

Table 5 shows the exposure estimates for HT-2 toxins. The PDI calculated were between 17.90 and 6.39 ng/kg bw day. The %PMTDI were 29.84% and 10.65% for children and adults population.

Table 5. *Patulin exposure calculated for children and adults through fruit juice consumption*

Commodity	Population group	PDI ng/kg bw	PMTDI (ng/kg bw)	%PMTDI
Apple juice	Children	26.72	400	6.68
	Adults	9.54	400	2.38
Orange juice	Children	27.67	400	6.91
	Adults	8.94	400	2.35
Pineapple juice	Children	6.44	400	1.61
	Adults	2.3	400	0.57
Mixed juice	Children	6.87	400	1.71
	Adults	2.45	400	0.61

Table 6. *HT-2 toxin exposure calculated for children and adults through fruit juice consumption*

Commodity	Population group	PDI ng/kg bw	PMTDI (ng/kg bw)	%PMTDI
Mixed juice	Children	17.90	60	29.84
	Adults	6.39	60	10.65

Conclusions

The herein used analytical procedure was suitable to quantify fifteen mycotoxins in fruit juice products. 36% of the analyzed samples were contaminated by PAT and 7% resulted positive for HT-2 toxins. One orange juice sample exceeded the maximum limit of PAT (50 µg/L).

The risk assessment shows that the intake of patulin through the consumption of fruit juice does not represent a risk for the population. Nevertheless, a risk dietary exposure for HT-2 toxins by mixed juice samples reached 29.84% of PMTDI. The results highlight the necessity for rigorous monitoring studies.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-77610-R) and Government Scholarship program "Carlos Antonio López – Paraguay"

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest and informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. *Fromme, H., Gareis, M., Völkel, W., & Gottschalk, C.* (2016). Overall internal exposure to mycotoxins and their occurrence in occupational and residential settings–An overview. International journal of hygiene and environmental health, 219(2), 143-165.
2. *Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A. S., Pereira, M., & Venâncio, A.* (2016). A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes. Critical reviews in food science and nutrition, 56(2), 249-265.
3. *Serrano, A. B.; Font, G.; Ruiz, M. J.; Ferrer, E*. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. Food Chem. 2012, 135, 423−429.
4. *Oteiza, J. M., Khaneghah, A. M., Campagnollo, F. B., Granato, D., Mahmoudi, M. R., Sant'Ana, A. S., & Gianuzzi, L*. (2017). Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. LWT-Food Science and Technology, 80, 200-207.
5. European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2006, L364, 5–24
6. *Li, X., Li, H., Ma, W., Guo, Z., Li, X., Li, X., & Zhang, Q.* (2018). Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. Food chemistry, 257, 1-6.
7. *Marino, A., Nostro, A., & Fiorentino, C. (*2009). Ochratoxin A production by Aspergillus westerdijkiae in orange fruit and juice. International journal of food microbiology, 132(2-3), 185-189.
8. *Zouaoui, N., Sbaii, N., Bacha, H., & Abid-Essefi, S.* (2015). Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. Food Control, 51, 356-360.
9. *Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L.* (2008). Occurrence of patulin and its dietary intake through pear, peach, and apricot juices in Italy. Food Additives and Contaminants, 1(2), 134-139.
10. *Juan, C., Mañes, J., Font, G., & Juan-García, A.* (2017). Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. LWT - Food Science and

Technology, 86, 344-351.

11. *Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Lacina, O., Fenclova, M., Veprikova, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J.* (2015). Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure. Food control, 47, 577-584.

12. *Murillo-Arbizu, M., Amézqueta, S., González-Peñas, E., & de Cerain, A. L.* (2009). Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. Food Chemistry, 113(2), 420-423.

13. *Ruan, C., Diao, X., Zhang, H., Zhang, L., & Liu, C*. (2016). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction technique for the analysis of citrinin, alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices. Analytical Methods, 8(44), 7944-7950.

14. *Zgoła-Grześkowiak, A., & Grześkowiak, T.* (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 30(9), 1382-1399.

15. *Escrivá, L., Manyes, L., Font, G., & Berrada, H.* (2017). Mycotoxin Analysis of Human Urine by LC-MS/MS: A Comparative Extraction Study. Toxins, 9(10), 330.

16. *Juan, C., Berrada, H., Mañes, J., & Oueslati, S.* (2017). Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. Food and Chemical Toxicology, 103, 148-156.

17. *Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J. C., Berrada, H., & Font, G.* (2013). Determination of deoxynivalenol in wheat-based snacks by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. Revista de Toxicología, 30 (2).

18. *Pallarés, N., Font, G., Mañes, J., & Ferrer, E.* (2017). Multimycotoxin LC–MS/MS Analysis in Tea Beverages after Dispersive Liquid–Liquid Microextraction (DLLME). Journal of agricultural and food chemistry, 65(47), 10282-10289.

19. SANCO. 2017. Document No. SANCO/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

20. EFSA. (2010). Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. EFSA Journal, 8(3), 1557

21. MAPAMA. (2016). Fruit juice consumption. Alimentary Statistics – Food Consumption. http://www.mapama.gob.es

22. EFSA, 2002. Report of experts participating in Task 3.2.8, 2002. Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/3.2.8_en.pdf.

23. JECFA, 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food Prepared by the Fifty-Sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.WHO Food Additives Series, vol. 47.

24. *Cho, M. S., Kim, K., Seo, E., Kassim, N., Mtenga, A. B., Shim, W. B., ... & Chung, D. H.* (2010). Occurrence of patulin in various fruit juices from South Korea: an exposure assessment. Food Science and Biotechnology, 19(1), 1-5.

25. *Lee, T. P., Sakai, R., Manaf, N. A., Rodhi, A. M., & Saad, B.* (2014). High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. Food Control, 38, 142-149.

26. Drusch, S., & Ragab, W. (2003). Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. Journal of food protection, 66(8), 1514-1527.

27. *López, P., De Rijk, T., Sprong, R. C., Mengelers, M. J. B., Castenmiller, J. J. M., & Alewijn, M*. A mycotoxin-dedicated total diet study in the Netherlands in 2013: Part II–occurrence. World Mycotoxin J. 2016, 9, 89-108.

28. *Poapolathep, S., Tanhan, P., Piasai, O., Imsilp, K., Hajslova, J., Giorgi, M., ... & Poapolathep, A.* (2017). Occurrence and Health Risk of Patulin and Pyrethroids in Fruit Juices Consumed in Bangkok, Thailand. Journal of food protection, 80(9), 1415-1421.

29. *Moukas, A., Panagiotopoulou, V., & Markaki, P.* (2008). Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. Food chemistry, 109(4), 860-867.

30. *Rahimi, E., & Rezapoor Jeiran, M.* (2015). Patulin and its dietary intake by fruit juice consumption in Iran. Food Additives & Contaminants: Part B, 8(1), 40-43.

Síndrome neuroléptico maligno asociado a la administración del haloperidol. Caso clínico

*Alonso Marín J.[2], Castañeda Arango C.[1], Palomino Camargo L.[1], Pérez Agudelo J.J.[1], Castro Álvarez J.F.[3]**

[1]Corporación Universitaria Remington
[2]Hospital Marco Fidel Suarez, Corporación universitaria Remington, Universidad cooperativa de Colombia, universidad pontificia bolivariana, Laboratorio de toxicología secretaria de Movilidad de Medellín
[3]Grupo de Investigación en Salud del Adulto Mayor. Corporación Universitaria Remington.

Resumen: El síndrome neuroléptico maligno (SNM) es una complicación que se debe tener en cuenta como efecto adverso en la administración de psicofármacos. El SNM se caracteriza por una triada de hipertermia, encefalopatía y rigidez muscular, donde las alteraciones disautonomicas y de conciencia son muy predominantes. Se describe el caso clínico de una paciente de 32 años de edad con antecedente personal de trastorno afectivo bipolar diagnosticada en un centro de atención en enfermedad mental de la ciudad de Medellín quien venía medicada con haloperidol y desarrolla el SNM. Se hace una detallada presentación clínica del caso, su evolución, las complicaciones asociadas y el manejo farmacológico que realizó toxicología en el hospital al que fue remitida.

Palabras claves: Síndrome neuroléptico maligno; bloqueador no receptivo de los bloqueadores de dopamina/haloperidol efectos adversos; bromocriptina; rabdomiólisis.

Abstract: ***Clinical Case Report: Neuroleptic malignant syndrome associated with the administration of haloperidol***

Neuroleptic malignant syndrome (NMS) is a complication that must be taken into account as an adverse effect in the administration of psychotropic drugs. NMS is characterized by a triad of hyperthermia, encephalopathy and muscular rigidity, where dysautonomy and consciousness disorders are prevalent. We describe the case of a 32-year-old woman with a personal history of bipolar affective disorder diagnosed in a mental health care center in the city of Medellin, who was medicated with haloperidol and developed NMS. A detailed clinical presentation of the case, its evolution, the associated complications and the pharmacological management that toxicology is carried out in the hospital to which it was referred.

Keywords: Neuroleptic malignant syndrome; non-receptive blocker of dopamine / haloperidol blockers adverse effects; bromocriptine; rhabdomyolysis.

Introducción

El síndrome neuroléptico maligno (SNM) fue descrito por primera vez en 1960 en asociación con el uso de haloperidol, por el médico francés Jean Delay(Langan, Martin, Shajahan, & Smith, 2012; Vargas & Gómez-Restrepo, 2006).Este se define como la presencia de rigidez muscular severa, asociada a elevación de la temperatura en un individuo en tratamiento con medicación neuroléptica(Delgado et al., 2016; Vargas & Gómez-Restrepo, 2006). El SNM se debe acompañar de dos o más de los siguientes síntomas: diaforesis, disfagia, temblor, incontinencia, cambios en la conciencia, mutismo, taquicardia, aumento de la presión arterial, leucocitosis, elevación de creatinfosfokinasa (CPK), siempre en compañía del uso de la medicación(Barahona, 2011; Belvederi Murri et al., 2015).

La incidencia del SNM a nivel mundial varía del 0.4 al 2.4% de los pacientes que se encuentran en manejo con medicamento neuroléptico(González-Blanco, García Prada, Santamarina Montila, Jiménez-Treviño, & Bobes García, 2013). Dentro de estos se encuentran todos aquellos que bloqueen el receptor D2 para dopamina a nivel central incluyendo antipsicóticos típicos y atípicos: proclorpenazina, metoclopramida (antieméticos), droperidol (anestésico), prometazina (sedante), entre otros(Greil, Häberle, Schuhmann, Grohmann, & Baumann, 2013; Reyes Calderón, 2005; Sachdev, Mason, & Hadzi-Pavlovic, 1997).La mortalidad oscila entre 10% y 38% de los casos, en los últimos años ha disminuido con la realización del diagnóstico e intervención precoz(Escobar Córdoba, Polanía-Dussán, & Toro-Herrera, 2011; Langan et al., 2012). El SNM se presenta en ambos sexos de manera similar y el mecanismo de presentación es idiopático, pero puede asociarse a una susceptibilidad personal y dentro de los factores predisponentes el más importante son las enfermedades psiquiátricas(Arslankoylu, Kutuk, Okuyaz, & Toros, 2011; Verma, Junewar, & Rathaur, 2014).

La fisiopatología del SNM esta mediada por reducción de la actividad dopaminérgica en el sistema nervioso central afectando los núcleos de la base y el hipotálamo, apareciendo alteraciones del tono muscular, de la conciencia, hipertermia e inestabilidad autonómica sin importar el tiempo de tratamiento con los neurolépticos(Greil et al., 2013; Kishimoto, Nakamura, Arai, Yukimasa, & Fukami, 2013; Tu & Hsiao, 2011). Las complicaciones más frecuentes son deshidratación, insuficiencia renal aguda, rabdomiólisis y coagulación intravascular diseminada(Dixit, Shrestha, & Adelman, 2013; Patil, Gupta, Verma, & Singh Balhara, 2016).Entendiendo la evolución y presentación clínica del SNM, en el presente artículo se describe el caso clínico de una paciente con diagnóstico de trastorno afectivo bipolar tratado con haloperidol a dosis terapéuticas la cual al inicio del tratamiento desarrolla cuadro clínico compatible con SNM y sus posteriores complicaciones.

Presentación del caso

Paciente femenina de 32 años de edad con antecedente patológico de trastorno afectivo bipolar y déficit cognitivo; quien en su casa presentó cuadro clínico de agitación y conducta agresiva, sin reconocimiento de sus familiares por lo cual deciden ingresarla el mismo día al centro de atención en enfermedad mental, donde se encuentra descompensación de su patología psiquiátrica de base, motivo por el cual deciden instaurar manejo farmacológico con antipsicóticos y benzodiacepinas. Al segundo día de hospitalización presentó malestar general, agitación constante, rigidez y fiebre, por lo cual inician manejo y estudio frente a la posible causa de SNM, es remitida al centro de toxicología para ser valorada, donde se decide hospitalizar.

En la valoración por toxicología se encuentra paciente orientada en espacio, tiempo y persona con frecuencia cardiaca de 99 latidos por minuto, presión arterial de 128/80 mmHg, frecuencia respiratoria 22 respiraciones por minuto, saturación parcial de oxigeno de 90%, temperatura axilar de 36.5, pupilas isocóricas reactivas a la luz, sin nistagmos, murmullo vesicular conservado, sin agregados, ruidos cardiacos rítmicos, sin soplos. Abdomen blando, depresible, peristaltismo presente sin signos de irritación peritoneal, sin masas ni megalias, se encuentra bradipsiquica, ansiosa e inquieta en el momento, sin rigidez ni rueda dentada.

En los análisis realizados se encuentran como datos más relevantes el valor de la CPK de 17922 U/L (Tabla 1). Por el reporte de este y por

*e-mail: silvia.espin@um.es

Tabla 1: *Paraclínicos de ingreso y control de la paciente.*

Valores de paraclínicos			
Parámetro	**De ingreso**	**De control**	**Valores de referencia**
Hematología			
Hemoglobina	12,9g/dl	10,42 g/dl	10,9 -14 g/dl
Hematocrito	41,3 %	32,12%	33-36 %
Recuento total de leucocitos	13480/ mm^3	2.924 / mm^3	4.500-15.000/ mm^3
Plaquetas	137.000 /mm^3	87.400 / mm^3	150 000 -450000/ mm^3
Enzimas hepáticas			
Alt	10,8 UI/L	123 UI/L	5- 45 UI/L
Ast	64 UI/L	90 UI/L	10-50 UI/L
Química sanguínea			
Creatinina	1.19 mg/dl	0.62 mg/dl	0,3-0,7 mg/dl
Cpk	17922 UI/L	366UI/L	< 94 UI/L
Proteina C reactiva	7.8 mg/dl	18,8 mg/dl	< 2 mg/dl
Electrolitos séricos			
Sodio	157 mE-q/l	144,3mE-q/l	135-145mE-q/l
Potasio	3.9 mE-q/l	3,85 mE-q/l	3,5-5mEq/l
Magnesio	2.72 mE-q/l	1,92 mE-q/l	1,5-2 mg/dl
Cloro	119 mE-q/l	107,4mE-q/l	102 - 120mE-q/l

Alt: alanina aminotransferasa
Ast: aspartato aminotransferasa
Cpk: Creatinfosfoquinasa

los signos clínicos encontrados en el examen físico, como fue la rigidez muscular, se instaura tratamiento con líquidos endovenosos hartman bolo de 1500cc, ranitidina ampollas 50 mg cada 8 h intravenoso (iv)se sustituye haloperidol por quetiapina (antipsicótico atípico) tableta 25 mg cada noche vía oral (vo), midazolam 3 mg cada 8 h intramuscular (im), bromocriptina tableta 2.5 mg cada 8 h (vo), ácido valproico 250 mg cada 8 h (vo).

Al tercer día presenta mejoría de los síntomas, pero relata sentir sensación de miedo por lo cual no colabora con el interrogatorio y el examen físico, se encuentra afecto predominante de tristeza y rabdomiólisis con una disminución de la CPK respecto a la previa, hipercloremia e hipernatremia por lo que se decide continuar infusión con bicarbonato y líquidos endovenosos. Se suspende midazolam y la ranitidina, se continua con: lorazepam 2 mg (vo) cada 8 horas, ácido valproico 250 mg (vo) cada 8 horas, bromocriptina 2.5 mg cada 8 h, hartman 150 cc/h, bicarbonato de sodio ampollas de 10 miliequivalentes (mEq) en bomba de infusión para 6 horas, omeprazol 20 mg (vo) cada 24 h, midazolam 5 mg (im).

Al cuarto día se encuentra paciente febril con una saturación parcial de oxigeno de 85%, con roncus y crepitos en bases de predominio izquierdo, hipopotasemia con un potasio de 2.89 (mEq). Se le ordenó rayos X de tórax el cual reportó a nivel de base de pulmón izquierdo consolidación, broncograma aéreo e infiltrados parahiliares bilaterales, sin derrame pleural, ni alteración mediastínica, no se evidencia masas ni cavernas. Se realiza manejo farmacológico con oxígeno por cánula nasal a 3 litros/minuto, ampicilina sulbactam 3 gr cada 6 h (iv) y reposición de potasio para corrección de la hipopotasemia.

Los nuevos análisis realizados reportan leucopenia, trombocitopenia, anemia, neutropenia, sin alteración renal, el potasio presenta mejoría a comparación de controles, persiste la hipernatremia, posiblemente secundaria a proceso infeccioso. Se continúa igual manejo y se solicita valoración por medicina interna quien encuentra la paciente taquipneica y taquicardica, ordenando muestras para hemocultivos. En la ronda por toxicología clínica se encuentra paciente con mejoría del cuadro clínico con adecuada respuesta al tratamiento, se disminuye dosis de bromocriptinatabl 2.5 mg cada 12 h (vo).

Al sexto día se encuentra la paciente muy somnolienta por lo cual se decide disminuir la dosis del lorazepam a 2mg cada 12 horas.

Se suspende la bromocriptina, se inicia salbutamol inhalado 4 aspersiones cada 8 horas. Se inicia nueva dosis de alcalinización con infusión de bicarbonato, enoxaparina 40 mg cada día subcutánea, e infusión de potasio.

Al séptimo se encuentra paciente con resolución del SNM y del cuadro neumónico, presentado una adecuada respuesta a la terapia farmacológica intrahospitalaria. Los análisis de control evidencian una disminución en la CPK total con un valor para ese día de 360 U/Lya en rango de seguridad y sin requerir intervenciones adicionales para rabdomiólisis. El hemoleucograma muestra persistencia de leucopenia (2942 cell/mm3) con anemia y trombocitopenia (en rango de seguridad), la alteración hematológica corresponderá muy posiblemente a una alteración asociada al uso crónico de antipsicóticos y moduladores del ánimo, se suspende antibiótico y se ordena remisión a psiquiatría para que continúe el manejo de su enfermedad mental descompensada. La paciente se da de alta por toxicología clínica.

Discusión

El SNM es una complicación neurológica infrecuente, pero muy grave(Giroud Benítez, Velázquez Velázquez, Silva Laureido, & González Torres, 2001).Con una elevada mortalidad, que alcanza un 10-20% en los casos no tratados de manera precoz(Colón Núñez, López Santacruz, & Brito Hernández, 2017; Escobar Córdoba et al., 2011). Aunque en el año 2005,Ming-Che Tu et al, reporta una disminución de esta mortalidad que décadas anteriores era hasta del 76%(Tu & Hsiao, 2011).Existen reportes como el de Tse et al en el cual por medio de una revisión que analizó los datos epidemiológicos disponible en la literatura arrojó una estimación global de 0.991 casos por cada mil personas(Tse, Barr, Scarapicchia, & Vila-Rodriguez, 2015).En la actualidad la terapia con neurolépticos sigue siendo necesaria para el control de algunas patologías psiquiátricas, por esta razón se debe tener una alta sospecha en los pacientes que están tomando esta clase de psicofármacos y a su vez cursando con la sintomatología del SNM.

Martino BelvederiMurriet al realizaron una revisión sistemática sobre la asociación de antipsicóticos típicos y atípicos asociados a SNM en PubMed hasta el año de 2013, encontrando que los antipsicóticos típicos causan una mayor severidad en la sintomatología comparados con los atípicos(Belvederi Murri et al., 2015). Esto confirma lo evidenciado en la presentación de este caso clínico en el cual la paciente cursó con todas las complicaciones descritas en la literatura de SNM. Hay reportes de SNM como el de Ananth J et al, donde describen la incidencia de SNM con antipsicóticos atípicos que va de 0,02% a 2,44%, siendo descrito en relación a clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina y amisulpirida(Ananth, Parameswaran, Gunatilake, Burgoyne, & Sidhom, 2004). La mortalidad del síndrome en relación con estas drogas es menor que el producido por antipsicóticos clásicos como el haloperidol, medicamento utilizado en la paciente de este caso clínico.Karagianis et al revisaron en Medline todos los casos descritos entre 1966 y 1998, y encontraron que las características clínicas más frecuentes del SNM atípico son taquicardia, confusión, y diaforesis. La fiebre, rigidez y aumento de CPK son menos prominentes que en el SNM producido por antipsicóticos típicos como el haloperidol(Karagianis, Phillips, Hogan, & Ledrew, 1999).

Una vez se sospecha el diagnóstico se debe suspender inmediatamente el medicamento causante e iniciar las medidas generales del tratamiento(Denis, Vera, Recalde, Paats, & Esteche, 2017; Saritas, Cankaya, & Yosunkaya, 2014). Dentro del manejo de las manifestaciones clínicas se debe administrar un fármaco dopaminérgico como lo es la bromocriptina a dosis de 7,5 a 15 mg/día y dantroleno para la relajación muscular con una dosis inicial de 2 mg/kg(Saritas et al., 2014). Arango reporta que no hay evidencia de

gran peso en la literatura, ya que, por la baja frecuencia de este síndrome, no hay grandes ensayos clínicos, pero los reportes han logrado mostrar la utilidad de éstas(Arango, 2002).La indicación con los dopaminérgicos es repetir las dosis hasta que los síntomas cedan, en el tratamiento de la paciente del presente caso clínico se le instauró un solo medicamento con una respuesta muy satisfactoria de la resolución de las complicaciones que desarrollo durante los días de hospitalización. Aun así corroborando con la literatura no hay estudios que avalen la eficacia de ambos(Arango, 2002; Mazhar, Akram, Haider, & Ahmed, 2016; Sachdev et al., 1997).

En este caso se inició manejo con hidratación, medidas para disminuir la temperatura, se instauro la bromocriptina a una dosis de 5 mg cada 8 horas (vo), y se hizo suspensión del haloperidol que fue el fármaco causante, presentándose una evidente mejoría de los síntomas, con una marcada disminución del CPK en comparación con la del ingreso.

Las complicaciones presentadas fueron la rabdomiólisis, la insuficiencia respiratoria, sepsis, complicaciones frecuentes que pueden llevar la paciente a un estado crítico incluso la muerte si no son tratadas de la manera adecuada(Neuhut, Lindenmayer, & Silva, 2009; Patil et al., 2016). Se registran varios reportes de casos clínicos similares, Salinas et al manejaron varios diagnósticos diferenciales antes de plantear el SNM, por lo que al momento de la instalación de la terapia correcta el cuadro estaba ya muy avanzado(Salinas S, Laso F, & Vargas C, 2014). Ventura et al concluye que el SNM es una urgencia que de no tenerse en cuenta y tratarse precoz y adecuadamente lleva al paciente a la muerte (Salinas S et al., 2014). En otro reporte de caso clínico el cual tuvo la misma evolución clínica que el caso clínico expuesto en este trabajo, Barrios etal, asocia el desarrollo del SNM al uso de un neuroléptico oral de baja potencia, donde la paciente falleció de una complicación frecuente (Barrios & Molino, 2003; Tse et al., 2015). El factor común es la mala evolución de la enfermedad y la alta letalidad por no realizarse a tiempo el diagnóstico, por lo tanto, es de suma importancia mantener una alta sospecha clínica ante la presencia de la triada clásica que sugiera cuadro clínico compatible con SNM e instaurar rápidamente su manejo.

Conclusiones

Se determinó que la paciente presento el SNM tras la administración del neuroléptico en este caso haloperidol. El abordaje y la intervención farmacológica con bromocriptina como agonista dopaminérgico D2 el manejo rápido de la sintomatología fue determinante para la resolución del SNM, evitando complicaciones graves que pudiesen comprometer la vida de la paciente.

Bibliografía

1. *Ananth, J., Parameswaran, S., Gunatilake, S., Burgoyne, K., & Sidhom, T.* (). Neuroleptic malignant syndrome and atypical antipsychotic drugs. J Clin Psychiatry, 2004; 65(4), 464–470.
2. *Arango, G.* Síndrome neuroléptico maligno. En Guía neurológica,6a ed. Bogotá: Asociación Colombiana de Neurología;2002. pp. 197–201
3. *Arslankoylu, A. E., Kutuk, M. O., Okuyaz, C., & Toros, F.*Neuroleptic malignant syndrome due to risperidone misdiagnosed as status epilepticus. Pediatric Reports. 2011; 3(3), 19. https://doi.org/10.4081/pr.2011.e19
4. *Barahona, T. H.* (). Síndrome Neuroléptico Maligno: un diagnóstico de exclusión. Etiologías, características y mecanismos patogénicos. BUN Synapsis. 2011; 3(2), 28–33.
5. *Barrios, J. D., & Molino, R.* Síndrome neuroléptico maligno: presentación de dos casos y revisión del tema. Rev méd cient. 2003; 16(2), 86–89.
6. *Belvederi Murri, M., Guaglianone, A., Bugliani, M., Calcagno, P., Respino, M., Serafini, G.,Amore, M.* Second-Generation Antipsychotics and Neuroleptic Malignant Syndrome: Systematic Review and Case Report Analysis. Drugs in R&D. 2015; 15(1), 45–62. https://doi.org/10.1007/s40268-014-0078-0
7. *Colón Núñez, S., López Santacruz, Y. A., & Brito Hernández, A.* Síndrome neuroléptico maligno. Presentación de un caso y revisión de la literatura. Qhalikay. Revista de ciencias de la salud.2017; 1, 13–18.
8. *Delgado, S. R., Tornes, L., Maldonado, J., Hernandez, J., Campos, Y., & Rammohan, K.* Neuroleptic Malignant Syndrome Associated with Refractory Acute Disseminated Encephalomyelitis. Case Rep Neurol. 2016; 8(1), 92–96. https://doi.org/10.1159/000446106
9. *Denis, A., Vera, R., Recalde, A., Paats, A., & Esteche, A.* Síndrome neuroléptico maligno like. Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int.. 2017; 4(2), 49–53. https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2017.04(02)49-053
10. *Dixit, D., Shrestha, P., & Adelman, M.* Neuroleptic malignant syndrome associated with haloperidol use in critical care setting: should haloperidol still be considered the drug of choice for the management of delirium in the critical care setting? BMJ Case Reports.2013; 2013(jul12 1), bcr2013010133-bcr2013010133. https://doi.org/10.1136/bcr-2013-010133
11. *Escobar Córdoba, F., Polanía-Dussán, I. G., & Toro-Herrera, S. M.* Tratamiento del síndrome neuroléptico maligno. Salud Uninorte. 2011; 27(2), 247–258.
12. *Giroud Benítez, J. L., Velázquez Velázquez, M., Silva Laureido, S., & González Torres, R.* Síndrome neuroléptico maligno. Rev Cubana Med Milit. 2001; 30(3), 206–211.
13. *González-Blanco, L., García Prada, H., Santamarina Montila, S., Jiménez-Treviño, L., & Bobes García, J.* Recidiva de un síndrome neuroléptico maligno. Actas Esp Psiquiatr 2013; 41(5), 314–318.
14. *Greil, W., Häberle, A., Schuhmann, T., Grohmann, R., & Baumann,* P.Age and adverse drug reactions from psychopharmacological treatment: Data from the AMSP drug surveillance programme in Switzerland. Swiss Med Wkly. 2013; 143(July), 1–13. https://doi.org/10.4414/smw.2013.13772
15. *Karagianis, J. L., Phillips, L. C., Hogan, K. P., & Ledrew, K. K..* Clozapine-Associated Neuroleptic Malignant Syndrome: Two New Cases and a Review of the Literature. Ann Pharmacother. 1999; 33(9), 623–630. https://doi.org/10.1177/106002809903300902
16. *Kishimoto, S., Nakamura, K., Arai, T., Yukimasa, O., & Fukami, N.* Postoperative neuroleptic malignant syndrome-like symptoms improved with intravenous diazepam: a case report. Journal of Anesthesia. 2013; 27(5), 768–770. https://doi.org/10.1007/s00540-013-1602-z
17. *Langan, J., Martin, D., Shajahan, P., & Smith, D. J.* Antipsychotic dose escalation as a trigger for Neuroleptic Malignant Syndrome (NMS): literature review and case series report. BMC Psychiatry. 2012; 12(1), 214. https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-214
18. *Mazhar, F., Akram, S., Haider, N., & Ahmed, R.* Overlapping of Serotonin Syndrome with Neuroleptic Malignant Syndrome due to Linezolid-Fluoxetine and Olanzapine-Metoclopramide Interactions: A Case Report of Two Serious Adverse Drug Effects Caused by Medication Reconciliation Failure on Hospital Admissi. Case Reports in Medicine.2016; 2016, 1–4. https://doi.org/10.1155/2016/7128909
19. *Neuhut, R., Lindenmayer, J.-P., & Silva, R.* Neuroleptic Malignant Syndrome in Children and Adolescents on Atypical Antipsychotic Medication: A Review. Journal of Child and Adolescent

Psychopharmacology. 2009; 19(4), 415–422. https://doi.org/10.1089/cap.2008.0130

20. *Patil, V., Gupta, R., Verma, R., & Singh Balhara, Y. P.*Neuroleptic Malignant Syndrome Associated with Lithium Toxicity. Oman Medical Journal. 2016; 31(4), 309–311. https://doi.org/10.5001/omj.2016.59

21. *Reyes Calderón, N. P.* Síndrome neuroléptico maligno (SNM): otras posibilidades diagnósticas. Rev. Colomb. Psiquiat.2005; XXXIV(1), 125–136.

22. *Sachdev, P., Mason, C., & Hadzi-Pavlovic, D.* Case-control study of neuroleptic malignant syndrome. American Journal of Psychiatry. 1997; 154(8), 1156–1158. https://doi.org/10.1176/ajp.154.8.1156

23. *Salinas S, C., Laso F, A., & Vargas C, A.*Síndrome neuroléptico maligno-like como complicación en enfermedad de Parkinson: Desenlace fatal. Reporte de un caso y revisión de la literatura. Revista chilena de neuro-psiquiatría. 2014; 52(2), 89–92. https://doi.org/10.4067/S0717-92272014000200004

24. *Saritas, T. B., Cankaya, B., & Yosunkaya, A.* Olanzapine-Induced Malignant Neuroleptic Syndrome. Turkish Journal of Anesthesia and Reanimation. 2014; 42(5), 288–291. https://doi.org/10.5152/TJAR.2014.46704

25. *Tse, L., Barr, A., Scarapicchia, V., & Vila-Rodriguez, F.*Neuroleptic Malignant Syndrome: A Review from a Clinically Oriented Perspective. Current Neuropharmacology. 2015 13(3), 395–406. https://doi.org/10.2174/1570159X13999150424113345

26. *Tu, M.-C., & Hsiao, C.-C.* Amisulpride and neuroleptic malignant syndrome. Chang Gung medical journal. 2011; 34(5), 536–40.

27. *Vargas, A., & Gómez-Restrepo, C.* Síndrome neuroléptico maligno. Rev. Colomb. Psiquiat.2006; 36(Supl. 1), 101–125.

28. *Verma, R., Junewar, V., & Rathaur, B. P. S.* (). An atypical case of neuroleptic malignant syndrome precipitated by valproate. Case Reports. 2014; 2014(mar06 1). https://doi.org/10.1136/bcr-2013-202578.

Bioaccesibilidad de arsénico y cálculos de ingestas en dietas consumidas por una población endémica de Taco Pozo. Comparación entre las ingestas infantiles y adultas

Avila Carreras, N.M.E., Bovi Mitre, M.G.

INQA (Investigación de Química Aplicada), Facultad de Ciencias Agrarias, UNJu. Alberdi N° 47. San Salvador de Jujuy, Jujuy Argentina. CP: 4600

Resumen: El arsénico es muy estudiado a nivel mundial, es altamente toxico en especial en su forma inorgánica arseniato [As(V)] y arsenito [As(III)]. El hombre se encuentra expuesto al arsénico principalmente mediante el agua de consumo y la dieta. El objetivo del trabajo fue determinar la bioaccesibilidad de arsénico en alimentos cocinados en una región endémica Chacosantiagueña de Argentina y estudiar la ingesta diaria en una población infantil y adulta a partir del arsénico bioaccesible cuantificable en los alimentos. Para la cuantificación de As-i bioaccesible se siguió el método in vitro de simulación del proceso de digestión gastrointestinal en sus dos etapas (gástrica e intestinal). Para el cálculo de la fracción bioaccesible se cuantificó el Arsénico luego del proceso de digestión gastrointestinal simulado y este valor corresponde al % de bioaccesibilidad con respecto al Arsénico cuantificado antes del proceso y que constituye el 100%. Para los mates y leches se consideró la totalidad del arsénico como inorgánico puesto que en el agua, éste es la principal especie. Los resultados muestran que el arsénico bioaccesible tiene valores entre 62,7-78 %, siendo el promedio 70,6%. Los rangos de las ingestas calculadas para la población infantil fueron de 11,3 a 350,9 µg/kgpc/día, mientras que en la población adulta fueron entre 5 a 30,2 µg/kgpc/día. La población infantil es la más expuesta al arsénico mediante la dieta.

Palabras claves: cálculos de ingestas; bioaccesibilidad; arsénico; población expuesta.

Abstract: ***Bioavailability of arsenic and intake calculations in diets consumed by an endemic population of Taco Pozo. Comparison between infant and adult intakes.***

Arsenic is very studied worldwide, it is highly toxic especially in its inorganic form arsenate [As (V)] and arsenite [As (III)]. Man is exposed to arsenic mainly through drinking water and diet. The objective of the work was to determine the bioavailability of arsenic in cooked foods in a Chacosantiagueña endemic region of Argentina and to study the daily intake in a child and adult population from quantifiable bioavailable arsenic in foods. To calculate the bioaccessible fraction, Arsenic was quantified after the simulated gastrointestinal digestion process and this value corresponds to the% of bioavailability with respect to Arsenic quantified before the process and which constitutes 100%. For mates and milks the totality of arsenic was considered as inorganic since in water, this is the main species. The results show that bioaccessible arsenic has values between 62.7-78%, with an average of 70.6%. The ranges of the intakes calculated for the infant population were from 11.3 to 350.9 µg / kgpc / day, while in the adult population they were between 5 to 30.2 µg / kgpc / day. The infant population is the most exposed to arsenic through diet.

Keywords: intake calculations; bioavailability; arsenic; exposed population.

Introducción

El arsénico existe en el ambiente y en los seres vivos como especies orgánicas e inorgánicas, siendo estas últimas las más tóxicas. Las especies inorgánicas más importantes a las que están expuestos los seres humanos son: arseniato [As(V)] y arsenito [As(III)] (*Tseng et al.*, 2007; Sommella et al., 2013). En América Latina, existen altas concentraciones de arsénico en suelos y agua asociados a los depósitos de cenizas y rocas volcánicas. También se observa que se asocia con óxidos metálicos, especialmente con óxidos de hierro, partículas de arcilla, sulfuros y materiales orgánicos (Bundschuh et al., 2012), siendo todo esto una característica distintiva de la presencia de arsénico en los países de América Latina.

En Argentina se han reportado altas concentraciones de arsénico en diferentes provincias como ser: Cordoba (Nicolli et al. 1989), Santiago del Estero (Bhattacharya et al. 2006), La Pampa (Farías et al. 2003; O´Reilly et al. 2010), Buenos Aires (Bundschuh et al. 2010), Chaco (Blanes et al. 2011; Buchhamer et al. 2012), entre otros.

El arsénico es considerado carcinogénico para humanos y se clasifica en el Grupo 1 según (IPCS 2001). La ingestión crónica de aguas arsenicales provoca la enfermedad llamada HACRE (hidroarsenicismo crónico regional endémico) (Biagini et al. 1978; Tsai et al. 1998) además de otras patologías como astemia, debilidad muscular, cefalea, neuropatías periféricas, alteraciones hepáticas y renales, deterioro del sistema nervioso central, leucemias, diversos tipos de cáncer (pulmón, riñón, vejiga, piel), desordenes cardiovasculares, hipertensión entre otros (Buchhamer et al. 2012; Wong et al., 2013; Li Gang et al., 2011). En la mayoría de los casos son necesarias décadas de exposición para observarse estas manifestaciones clínicas. La vía de ingreso principal al hombre es mediante el agua de consumo y los alimentos (Devesa et al., 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el C.A.A. 2010 recomiendan un nivel máximo de 10 µg/L de arsénico en agua de bebida. La OMS además estableció BMDL (límite inferior de confianza de la dosis de referencia) en 3,0 µg/kg peso corporal (pc) por día (2 µg/kg –7 µg/kg pc por día en base a la gama de la exposición alimentaria total estimada) (JEFCA 2010; Wong et al., 2013).

Sin embargo, el arsénico que se puede consumir a través de las dietas no siempre está todo bioaccesible. Se denomina bioaccesibilidad a la máxima concentración soluble del tóxico o nutriente en el medio gastrointestinal que queda disponible para ser absorbido por el epitelio intestinal (Torres-Escribano et al., 2011; Sun et al., 2012). Esta fracción, constituye la cantidad máxima que puede ser absorbida, pasando a la circulación para finalmente ser transportada a los órganos (Torres-Escribano et al., 2011; Sun et al., 2012) y allí producir su acción tóxica. El proceso de solubilización va a depender de factores intrínsecos de las personas como ser el estado fisiológico (embarazo, lactancia) y nutricional, la capacidad individual de adaptación a aportes variados de nutrientes, posibles anomalías genéticas, variabilidad interindividual, y de factores extrínsecos como ser la reacción con otros componentes del alimento o dieta, capacidad para competir con otras sustancias por órgano diana del organismo, forma química en que se encuentre, solubilidad y el aporte total de la sustancia por la dieta (Torres-Escribano et al., 2011).

Los métodos *in vitro* para evaluar la bioaccesibilidad emulan el proceso de la digestión gastrointestinal y consisten en simular todas las condiciones físico-químicas y enzimáticas posibles, seguido por la determinación de la fracción soluble (fracción bioaccesible) (Intawongse et al., 2008; Sun et al., 2012). Son métodos simples, rápidos y de bajo costo que ofrecen además la ventaja de buena reproducibilidad, al controlar el operador las condiciones de trabajo. Sin embargo, la bioaccesibilidad del arsénico depende de diversos factores intrínsecos como el estado fisiológico del individuo y la edad, entre otros y extrínsecos tales como el estado nutricional y la cantidad de contaminante consumido. También la composición química de los

*e-mail:avila.carreras@gmail.com

alimentos, según ciertos nutrientes o compuestos contaminantes, pueden modificar la bioaccesibilidad del tóxico. Así también, es importante conocer los cambios que pueden sufrir los alimentos durante la preparación. Un factor importante es la condición fisiológica del consumidor, puesto que esto varía de individuo a individuo pudiendo cambiar algunas condiciones que no pueden ser controladas durante el desarrollo del método *in vitro* (Torres-Escribano et al., 2011).

Los alimentos que aportan arsénico a la dieta del ser humanos son los productos de la pesca, tanto las algas como los pescados y mariscos (Calatayud et al., 2011), sin embargo las especies mayoritarias en estos alimentos son orgánicas: la arsenobetaína (AB) arsenocolina (AC) en pescados y arsenoazúcares en moluscos y bivalvos. Los contenidos de arsénico inorgánico no suelen superar los 0,1 mg/Kg (Moreda-Piñeiro et al., 2012). Los productos pesqueros presentan un importante porcentaje de arsénico biodisponible (83 - 114%), indicando así su alta bioaccesibilidad. El contenido de grasa en las muestras de productos pesqueros afecta la bioaccesibilidad del arsénico. Existe evidencia que mariscos con menor contenido graso, presentan una mayor biodisponibilidad (Moreda-Piñeiro et al., 2012).

El arroz es el alimento de origen vegetal en el que se describen las mayores concentraciones de arsénico total, pueden alcanzar 1 mg/Kg superando ampliamente los valores de otros cereales (Dabeka et al., 1993). En Bangladesh, se reportaron concentraciones de arsénico entre 1,23-2,05 mg/kg (Meharg et al., 2003), esto alarmó a productores, importadores y a la comunidad científica, incrementando las investigaciones. La presencia de arsénico en este cereal es debido a la existencia del contaminante en el suelo y/o en el agua de regadío, además el arroz tiene capacidad para traslocar el arsénico desde la raíz al grano (Li Gang et al., 2011). Las especies de arsénico detectadas en el arroz son arsénico inorgánico y en menor proporción ácido dimetilarsinico (DMA) y en forma ocasional ácido monometilarsónico (MMA). El porcentaje de arsénico inorgánico bioaccesible sobre el total es muy variable, 27-93%. El arroz integral presenta mayores concentraciones de arsénico inorgánico que el arroz pulido (Torres-Escribano et al., 2008).

Las concentraciones de arsénico en los alimentos procesados generalmente disminuyen debido a la solubilización. Bastias et al. 2010 estudio el efecto de la cocción en el contenido de t-As y en la especiación, indicando que son típicamente regulados por los procesos de solubilización, adsorción, quelación y volatilización (Bundschuch et al., 2012). Por ello, es importante estudiar la bioacesibilidad del tóxico. La comida es una fuente importante de exposición al arsénico en los seres humanos. Las concentraciones de arsénico pueden diferir entre los alimentos no cocinados y cocinados. Por lo tanto, el estudio de ingestas diarias debe realizarse en alimentos listos para el consumo (Saipan y Ruangwises 2010). La toxicidad del arsénico debe estudiarse a partir de sus especies más tóxicas, teniendo en cuenta su bioaccesibilidad y la cantidad consumida en la dieta. Todo esto nos indicará el nivel de exposición a través de la dieta.

El presente estudio tiene por objeto determinar la bioaccesibilidad de arsénico inorgánico en alimentos cocinados en una región endémica de Argentina y estudiar la ingesta diaria en población infantil y adulta a partir del arsénico inorgánico bioaccesible, con el fin de conocer la exposición poblacional a este tóxico.

Materiales y Métodos

Localización Geográfica de Estudio

Se realizó un muestreo en la región Chaco-Santiagueña, en la localidad de Taco Pozo ubicada en el Departamento de Almirante Brown, provincia del Chaco, (Argentina) a una latitud norte de -25,62 y una Longitud oeste de -63,28. Según los registros del INDEC 2001 la población total ascendía a los 8.470 habitantes.

El muestreo se realizó principalmente en escuelas primarias con comedores de Taco Pozo (considerando a estos como población infantil), y caseríos ubicados en los alrededores del pueblo (considerándolos como población adulta), que utilizan agua de pozo. El agua es la principal fuente contaminante de arsénico en los alimentos cocinados en la región.

Sobre N=88 muestras sólidas y N= 37 muestras líquidas, se analizó As bioaccesible en 23 raciones de alimentos de las escuelas de Rosillo y Sta. Teresa de Carballo, que fueron seleccionadas en forma aleatoria, como así también en familias de Taco Pozo.

Método de digestión gastrointestinal simulada para la determinación de la bioaccesibilidad de arsénico.

El método utilizado consiste en la simulación del proceso de digestión gastrointestinal en sus dos etapas, gástrica e intestinal, siguiendo el método descrito por Torres et al (2011). *Etapa gástrica*: La muestra (10 g de muestra fresca o su equivalente de muestra liofilizada) se pesó en un erlenmeyer. Se adicionaron 90 mL de agua desionizada y la mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl 6 M y transcurridos 5 minutos, se reajustó el pH en caso necesario. Posteriormente se adicionó 0,001 g de pepsina por gramo de muestra fresca, utilizando para ello una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0,1 M. La mezcla se completó hasta 100 g con agua de grado celular. Los erlenmeyers se cubrieron con parafilm y se incubaron en un baño de agua con agitación 120 golpes (min) a 37 ºC durante 2 h para emular la fase gástrica de la digestión. Transcurrido este tiempo, la digestión se interrumpió sumergiendo el erlenmeyer en un baño de hielo durante 10 minutos.

Etapa intestinal. Una vez finalizada la etapa gástrica, se ajustó el pH a 5 con $NaHCO_3$ 1 M. Se preparó una solución de pancreatina porcina al 0,4% (m/v) y extracto biliar porcino al 2,5% (m/v) en $NaHCO_3$ 0,1 M y se adicionó la cantidad necesaria para proporcionar $2,5 .10^{-4}$ g de pancreatina y $1,5.10^{-3}$ g de extracto biliar por gramo de muestra fresca.

Los erlenmeyers se cubrieron con parafilm y la mezcla se incubó nuevamente en agitación (120 golpes/min) durante 2 h a 37 ºC. Transcurrido este tiempo, los erlenmeyers se sumergieron en un baño de hielo durante 10 minutos. Una vez finalizada la etapa intestinal, se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 0,5 M. Posteriormente se transfirió el volumen del matraz a frascos de centrífuga con capacidad de 250 mL y se separó la fracción bioaccesible por centrifugación (10.000 rpm/30 minutos/4 ºC). Por último se filtra el sobrenadante a través de papel Whatman Nº 1 y se liofiliza antes de proceder a la determinación de arsénico total e inorgánico (Torres-Escribano et al., 2011; Sun et al., 2012).

El porcentaje del arsénico bioaccesible se estima mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = [S/C] \times 100$$

S es el contenido de arsénico en la fracción soluble, es el Arsénico luego del proceso de digestión gastrointestinal simulado

C es el Arsénico cuantificado antes del proceso y que constituye el 100%, es el contenido de arsénico en la muestra (ps)

La Cuantificación de arsénico total en el alimento se realizó mediante mineralización vía seca y cuantificación mediante espectrometría de absorción atómica acoplada a la generación de hidruro por inyección en flujo (FI-HG-AAS) según Díaz et al., (2004).

Calculo de ingestas

Para el cálculo de las ingestas diarias se consideró: las cuatro comidas (desayuno, almuerzo, merienda y cena) ingeridas por la población. Se tuvo en cuenta que en los alimentos líquidos la totalidad del arsénico se encuentra en forma de arsénico inorgánico, debido a que el mate cocido o leche se elaboran con agua, en la que el arsénico existente es únicamente inorgánico, según datos obtenidos en otros trabajos realizados con anterioridad (Litter et al., 2009). Se consideró 100 g para desayuno o merienda sólida, 250 g desayuno o merienda líquida, 300 g almuerzo o cena, un peso corporal de 25 Kg para la población

infantil y 70 Kg para la población adulta, y un consumo diario de agua de 1 litro para la población infantil 2 litros de agua para población adulta (Oguri et al., 2012; Wong et al., 2013).

Se calculó con la siguiente fórmula:

$$IDT = [X_{\sum AC} \times pc \times R]/PC$$

IDT= Ingesta diaria total de arsénico

$X_{\sum AC}$= promedio ($\mu g.g^{-1}$) de arsénico en todos los alimentos consumidos en el día.

pc= peso de la porción consumida (g)

R= Repeticiones de la porción consumida

PC= peso corporal del individuo (kg)

Resultados

Arsénico total bioaccesible en alimentos de Taco Pozo

Los muestreos elegidos para el estudio de bioaccesibilidad incluyen al particular (Familia), a la escuela Santa Teresa de Carballo y escuela Rosillo de Taco Pozo. Los resultados de bioaccesibilidad de arsénico en los alimentos analizados se indican en la tabla 1. La media del porcentaje de arsénico bioaccesible fue superior al 40% en todas las muestras: 73% (54 a 91%) en el particular; 64% (14 a 80%) en la escuela Santa Teresa de Carballo; 66% (44 a 80%) en la escuela de Rosillo. El porcentaje de Bioaccesibilidad se calculó según la fórmula antes descripta.

Tabla 1. *Porcentaje de bioaccesibilidad de arsénico en muestras analizadas en tres puntos muestreados en Taco Pozo.*

N° Muestra	Muestreo	BA%
1		54
2		65
3		65
5	Familia Taco Pozo	91
6		72
7		81
8		80
9		75
10		69
11		77
12		70
13	Escuela Santa Teresa de	14
14	Carballo Taco Pozo	80
15		80
16		55
17		80
18		66
19		80
20		79
21	Escuela Rosillo Taco Pozo	44
22		55
23		74

La figura 1 presenta los resultados indicados en la tabla 1 reordenados en población adulta e infantil, mostrando que los porcentajes de bioaccesibilidad de arsénico inorgánico es mayor en los alimentos recolectados en casas de familias.

Se calculó la media y desviación estándar del arsénico bioaccesible diferenciando entre los particulares (población adulta) y los comedores escolares (población infantil), figura 1. Se realizó la prueba t Test dando un valor p= 0,2238 > 0,05, indicando que no existen diferencias significativas de arsénico bioaccesible entre ambas poblaciones.

Ingestas de arsénico inorgánico en Taco Pozo

A continuación se describen las ingestas diarias de arsénico

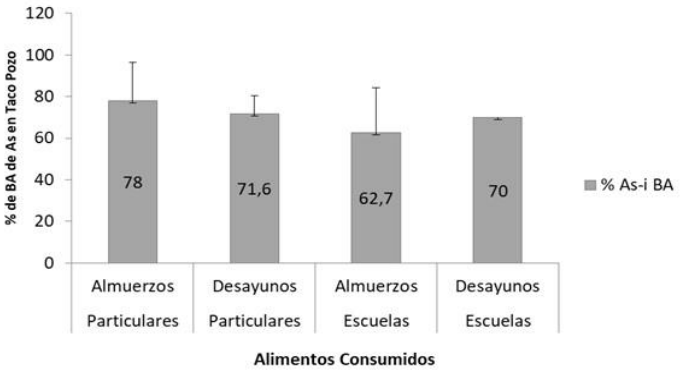

Figura 1: Porcentaje de bioaccesibilidad en almuerzos y desayunos de población adulta y población infantil.

inorgánico. Los cálculos de ingestas se realizaron tanto a la población adulta como a la infantil. En la tabla 2 se indican las ingestas diarias de arsénico inorgánico, expresados en µg/día, en cada uno de los lugares de muestreo, considerando el consumo de alimentos sólidos, alimentos líquidos y el agua de bebida. El cálculo de ingesta para la población adulta considera los contenidos de Arsénico en los alimentos recogidos en la Familia, mientras que los contenidos en los alimentos de las escuelas se utilizan para el cálculo de la población infantil. Cada una de estas poblaciones consume alimentos diferentes en cada una de las porciones diarias. Para ambas poblaciones se expresa la ingesta diaria en [µg/Kg peso corporal (pc)] y [µg/Kg peso corporal x 7] para la ingesta semanal.

A partir de las ingestas de arsénico inorgánico que figuran en la tabla 2, se calculó las ingestas totales de arsénico inorgánico tabla 3, para esto se consideró el arsénico en todas las porciones consumidas en el día, incluyendo el agua de bebida para cada una de las poblaciones. Para la ingesta semanal se tomó el promedio de la ingesta diaria y se multiplicó por los 7 días de la semana. En todos los puntos de muestreo, la ingesta de arsénico inorgánico para las poblaciones infantiles (20-71 µg/Kg pc/día) superan ampliamente el BMDL fijado actualmente por lo OMS (2-7 µg/Kg pc/día), mientras que la ingesta de arsénico inorgánico para población adulta de Taco Pozo (7,1 µg/Kg pc/día) se aproxima al valor tolerable provisional. Ambas poblaciones superan el valor de referencia que la OMS fijaba en el año 2007 en el que se realizó el muestreo (2,1 µg/Kg pc/día o 15 µg/Kg pc/semana).

Se aplicó además el t Test para una media a los fines de comparar la ingesta infantil y adulta obteniendo un valor *p= 0,2828*, indicando que tampoco existen diferencias significativas entre ellas.

Calculo de ingestas consideradando la bioaccesibilidad

A las ingestas diarias calculadas se le realizó una corrección según el promedio de bioaccesibilidad obtenidos de las muestras analizadas, equivalente a 70,6%. Se observa que el nivel de exposición supera la reglamentación vigente en ambas poblaciones al momento del estudio, figura 2.

La figura 3, muestra la relación encontrada entre el aporte de arsénico en la ingesta de agua y en los alimentos.

Ingestas en alimentos agrupados

También se calculó las ingestas diarias de arsénico inorgánico a partir de las porciones de desayunos/meriendas, almuerzos/cenas agrupadas por similitud en su composición, siendo los grupos: pan, platos a base de arroz, guisos y otros (asados, milanesas, albóndigas entre otros). Las figuras 4 muestran las ingestas diarias de arsénico total e inorgánico en ambas poblaciones. Se observa que el grupo de alimentos que mayor aporte de arsénico inorgánico realiza a la ingesta infantil son los guisos y los platos a base de arroz, mientras que en la población adulta el mayor aporte de arsénico inorgánico lo realizan el grupo otros alimentos, seguido de los guisos.

Tabla 2. *Ingestas diarias y semanales. Medias, desviaciones estándar y rangos expresados en µg/día, µg/Kg pc/día y µg/Kg pc/semana de arsénico inorgánico (As-i) en población adulta e infantil de Taco Pozo, discriminados en alimentos sólidos, líquidos y agua.*

Muestreos	Aporte	As-i µg/día Media	As-i µg/día Rango	Población Infantil Ingestas medias As-i		Población Adulta Ingestas medias As-i	
				µg/kgpc/día	µg/kgpc/sem	µg/kgpc/día	µg/kgpc/sem
Familias de Taco Pozo	Alimentos Sólidos	177,5 ± 6,5	50-433			2,5	18
	Alimentos Líquidos	120 ± 6,4	119-835			1,7	12
	Agua	202 ± 14,1	192-212			2,9	20
Escuela Fe y Alegría	Alimentos Sólidos	95	84-124	4	28		
	Alimentos Líquidos	82	81-83,5	3	21		
	Agua	218	196-240	9	63		
Escuela Teresa de Carballo	Alimentos Sólidos	413	281-479	16,5	116		
	Alimentos Líquidos	458	134-564	18,5	129,5		
	Agua	904	770-970	36	252		
Escuela Rosillo	Alimentos Sólidos	106	19-297	4	28		
	Alimentos Líquidos	121	134-564	5	35		
	Agua	1025	959-1090	41	287		

Tabla 3. *Ingesta de arsénico inorgánico (As-i) expresado en µg/Kg pc/día y µg/Kg pc/semana, en la población infantil de Taco Pozo (escuelas) y en la población adulta de Taco Pozo (familias Particulares).*

Muestreo	Población Infantil Ingesta As-i		Población Adulta Ingesta As-i	
	µg/kgpc/día	µg/kgpc/sem	µg/kgpc/día	µg/kgpc/sem
Particulares (Familias)	-	-	7,1 ± 1,2	49,9
Escuela Fe y alegría	16 ± 3,2	112		
Escuela Santa Teresa de Carballo	71 ± 75	497		
Escuela Rosillo	50 ± 145	350		

Nota: La IS fue calculada a partir de la ID multiplicada por 7 (días de la semana).

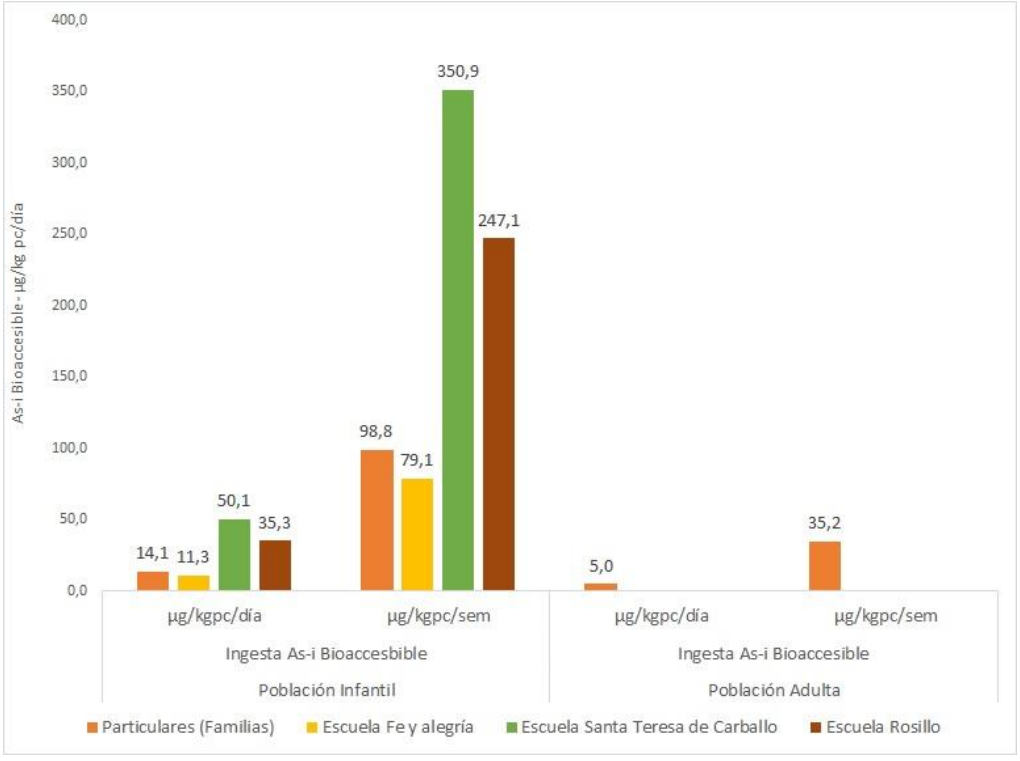

Figura 2: Ingesta de As-i Bioaccesible en alimentos consumidos por población infantil y adulta.

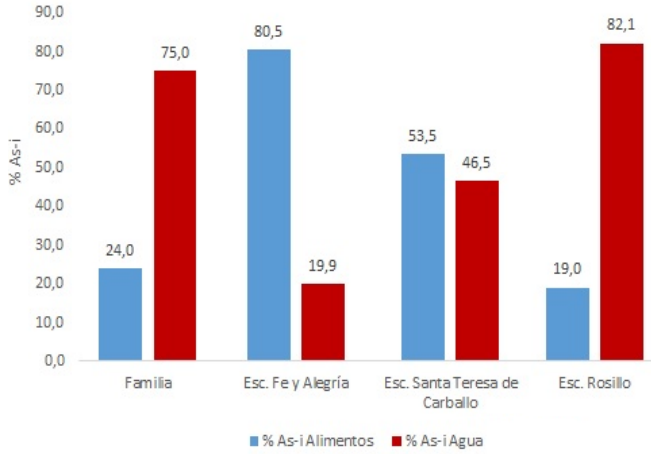

Figura 3: Porcentaje de As-i en aguas y alimentos consumidos en Taco Pozo.

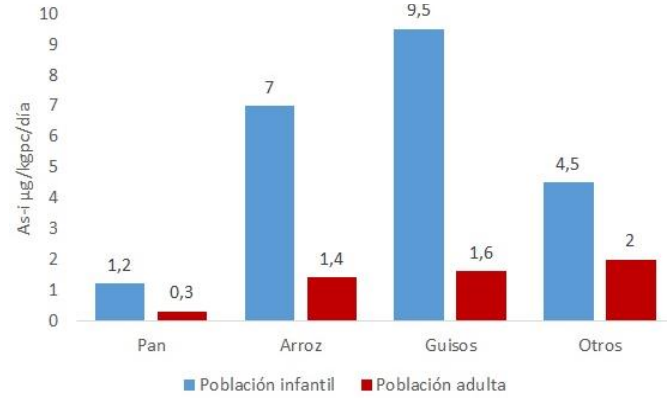

Figura 4: Ingestas diarias de As-i en los alimentos cocinados y agrupados según

Discusión

Bioaccesibilidad de arsénico

Los resultados de bioaccesibilidad obtenidos en Taco Pozo, indica que el 60% de las muestras analizadas en este estudio, superan el 70% de arsénico inorgánico bioaccesible y el 30% se encuentran en un rango de 50 a 69% de bioaccesibilidad de arsénico, mientras que un 10% se halla por debajo del 50%. Esto indica un alto grado de bioaccesibilidad del arsénico. Valores similares fueron hallados en estudios realizados en alimentos de origen marino donde la bioaccesibilidad de las especies más tóxicas de arsénico se encuentran en rangos de 87 a 106% para As(III) y 90 a 113% de As(V) Moreda-Piñeiro et al. (2012).

En Santa Teresa de Carballo el 71% de las muestras contienen más del 70% de As-i bioaccesible, mientras que el 29% contiene arsénico bioaccesible en un rango de 14 a 55%. En Rosillo el 60% de las muestras analizadas superan el 74% de As-i bioaccesible mientras que el 40% presenta un rango de 44 a 55% de bioaccesibilidad. No se halló diferencias significativas ($p>0,05$) entre las medias de los porcentajes obtenidos entre poblaciones infantiles y adultas. No se ha podido acceder a bibliografía que cuantifique el arsénico bioaccesible en platos de comidas preparadas, lo que dificulta la discusión de estos resultados.

Cálculos de Ingestas de Taco Pozo

Analizando los resultados por grupos de alimentos se aprecia que la ingesta diaria de As-t a través del pan es de 35 µg.día^{-1}, de leches de 346 µg.día^{-1}, y de "otros" alimentos de 172 µg.día^{-1}.

Estos valores calculados son muy superiores a los descriptos por la IARC (2009) en Cataluña donde los aportes son 11,61 µg.día^{-1} en panes, 2,11 µg.día^{-1} leche y 2,3 µg.día^{-1} en carnes. Por otro lado, los mates cocidos aportan una ingesta media de 180 µg.día^{-1}, los guisos 222 µg.día^{-1}, el arroz 270 µg.día^{-1} y las polentas 287 µg.día^{-1}. En investigaciones realizadas en San Antonio de los Cobres, se determinó que la ingesta diaria promedio de As ronda aproximadamente 160 µg.día^{-1} por agua potable, café y té (Bundschuch et al., 2012).

La ingesta diaria de arsénico inorgánico en la población infantil oscilaron entre 675 a 2425 µg.g^{-1}, valores muy superiores a los citados por otros autores, tales como el rango 584 a 733 µg.g^{-1} descripto por Arain et al. (2009).

La ingesta diaria de arsénico en las poblaciones estudiadas indica que la población infantil más expuesta es la de la escuela Santa Teresa de Carballo con una ingesta diaria de 71 µg/kg pc/día, mientras que la población adulta correspondiente a la familia particular de Taco Pozo presenta una ingesta diaria de 7,1 µg/kg pc/día. Wong et al. (2013) describen en Hong Kong una ingesta diaria de 0,22 µg/kg pc/día, mientras que en áreas rurales de China se encontraron valores de ingestas diarias de 0,71 µg/kg pc/día (Li et al. 2011). Las ingestas calculadas en la región de Taco Pozo-Chaco, resultan ser muy superiores. En Bengala (India) lugar muy afectado por las altas concentraciones de arsénico en aguas, suelos y alimentos, se ha señalado una ingesta diaria de 27,78 µg/kg pc/día, presentando una concentración media de arsénico en agua de 0.24 µg.mL^{-1} Alam et al. (2002). Todas las poblaciones infantiles estudiadas superan ampliamente el BMDL 0,5 (2-7 µg/kg pc/día).

Del Razo, et al., (2002) indico que la ingesta total en Durango México fue de 38.5µg/día (11.3–67.5) mientras que en Lagunilla México 394.0 µg/día (97.5–683.7), valores inferiores a los obtenidos en este trabajo.

Se observa que a mayores concentraciones de arsénico en agua (mayor a 0,3 µg/mL), existe un mayor aporte de As por el agua que por los alimentos, sin embargo esta relación se invierte cuando disminuye la concentración de As en el agua (menor a 0,3 µg/mL) cobrando mayor importancia el aporte de As por los alimentos. Cabe señalar que se trata de aguas con concentraciones que superan el máximo permitido por la OMS.

Conclusión

La bioaccesibilidad de arsénico inorgánico en las dietas estudiada fue alta superando el 70%. Las ingestas de arsénico inorgánico bioaccesibles calculadas en Taco Pozo superaron ampliamente el BMDL0.5 (2 – 7 µg/kg/sem) propuesto por la OMS, siendo las poblaciones infantiles de Santa Teresa de Carballo y Rosillo las más expuestas. Se evidencia la necesidad de realizar un estudio de evaluación de riesgo a partir de los resultados obtenidos.

Conclusión

La bioaccesibilidad de arsénico inorgánico en las dietas estudiada fue alta superando

Agradecimientos

Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA CSIC), Conservación y Calidad de los Alimentos, Elementos Traza. Paterna, Valencia, Spain. Dra. Rosa Montoro – Velez Pacios, Dinoraz.

Bibliografía

1. *Alam, M.G.M., Snow, E.T., Tanaka, A.* "Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta Village, Bangladesh. The Science of the Total Environment (2003) 308: 83-96.

2. *Arain, M.B.; Kazi, T.G.; Baig, J.A.; Jamali, M.K.; Afridi, H.I.; Shah, A.Q.; Jalbani, N.; Sarfraz, R.A.* "Determination of arsenic levels in lake water, sediment, and foodstuff from selected area of Sindh, Pakistan: Estimation of daily dietary intake". Food and Chemical Toxicology. (2009) 47: 242–248

3. *Bastias J.M., Bermúdez M., Carrasco J., Espinosa O., Muñoz M., Galotto M.J. and Muñoz O.* "Determination of Dietary Intake of Total Arsenic , Inorganic Arsenic And Total Mercury in the

Chilean School Meal Program. Food Science and Technology International. (2010). DOI: 10,1177/1082013210367956.Disponible en: http://fst.sagepub.com/

4. *Bhattacharya, P., Claesson, M., Bundschuh, J., Sracek, O., Fagerberg, J., Jacks, G., Martin, R., Storniolo, A., and Thir, J.* "Distribution and mobility of arsenic in the Rio Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. Sci. TotalEnviron. (2006). 358: 97-120.

5. *Biagini, M., Rivero, M., and Salvador, S.* Córdoba, Hidroarsenicismo crónico y cáncer de pulmón. Arch. Argent. Dermatol. (1978) 48:151-158.

6. *Blanes, P.S., Buchhamer, E.E., and Giménez, M.C.* Natural contamination with arsenic and other trace elements in groundwater of the Central-West región of Chaco. J. Environ. Sci. Health A. (2011) 46:1197-1206.

7. *Buchhamer, E. E., Blanes, P. S., Osicka, R. M., Gimenez, M.C.* "Environmental Risk Assessment of Arsenic and Fluoride in the Chaco Province, Argentina: Research Advances. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. (2012) 75: 1437-1450. ISSN: 1528-7394 print/1087-2620 online.

8. *Bundschuh Jochen, Litter Marta, Ciminelli Virginia S.T., Morgada María Eugenia, Cornejo Lorena, Garrido Hoyos Sofia, Hoinkis Jan, Alarcón-Herrera Ma. Teresa, Armienta María Aurora, Bhattacharya Prosun.* "Emerging mitigation needs and sustainable options for solving the arsenic problems of rural and isolated urban areas in Latin America-A critical analysis". Water Research (2010) 44:5828-5845.

9. *Bundschuh, Jochen; Nath, Bibhash; Bhattacharya, Prosun; Liu, Chen-Wuing; Armienta, María Aurora; Moreno, López Myriam V.; Lopez, Dina L.; Jean, Jiin-Shuh; Cornejo, Lorena; Fagundes, Luciene; Macedo, Lauer; Filho, Alfredo Tenuta.* "Arsenic in the human food chain: the Latin American perspective". Science of the Total Environment (2012) 429: 92–106.

10. C.A.A. Código Alimentario Argentino. Capitulo XII, Artículo 982, (Res. Conj. SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007. (2010). (acceso 11 de noviembre 2017). Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/ CAPITULO_XII.pdf

11. *Calatayud, Marta; Devesa, Vicenta; Virseda, Juan Ramón; Barberá-Reyes; Montoro, Rosa; Velez, Dinoraz.* "Mercury and selenium in fish and shellfish: Ocurrence, Bioacceessibility and uptake by caco-2-cells. Food and Chemical Toxicology (2012) 50: 2696–2702.

12. *Dabeka, R. W.; McKenzie, A. D.; Lacroix, G. M. A.; Cleroux, C.; Bowe, S.; Graham, R. A.; Conacher, H. B. S.; Verdier, P.* "Survey of arsenic in total diet food composites and estimation of the dietary intake of arsenic by Canadian adults and children". J. AOAC (1993) 76: 14–25.

13. *Del Razo, L.M.; García-Vargas, G.G.; García-Salcedo, J.; Sanmiguel, M.F.; Rivera, M.; Hernández, M.C.; Cebrian, M.E.* "Los niveles de arsénico en los alimentos cocidos y la evaluación de la dieta de adultos la ingesta de arsénico en la Región Lagunera, México". Food and Chemical Toxicology (2002) 40: 1423–1431.

14. *Devesa V. y Montoro R.* Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. Food and Chemical Toxicology (2008) 46:1-8.

15. *Díaz, Oscar Pablo; Leyton, Irma; Muñoz, Ociel; Nuñez, Nelson; Devesa, Vicenta; Suner, María Angeles; Velez, Dinoraz y Rosa Montoro*. "Contribution of Water, Bread, and Vegetables (Raw and Cooked) to Dietary Intake of Inorganic Arsenic in a Rural Village of Northern Chile. J. Agric. Food Chem. (2004) 52: 1773-1779.

16. *Farías SS, Casa VA, Vazquez C, Ferpozzi L, Pucci GN, Cohen IM*. "Natural contamination with arsenic and other trace elements in groundwaters of Argentine Pampean Plain". Sci Total Environ. (2003) 309(1-3):387-99.

17. IARC. (2009). Arsenic and arsenic compounds. "Contaminantes químicos: Estudio de dieta total en Cataluña 2008".

18. *Intawongse, Marisa; Dean, John R.* "Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil". Environmental Pollution (2008) 152: 60-72.

19. IPCS, 2001: Arsenic and arsenic compounds. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud, Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (Nº 224 de la serie de la OMS Criterios de Salud Ambiental).

20. JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2010. Summary report of the seventy-second meeting, Rome, 16-25 February 2010.

21. *Li Gang, Sun Guo-Xin, Williams Paul N., Nunes Luis, Zhu Yong-Guan.* "Inorganic arsenic in Chinese food and its cancer risk". Environment International (2011) 37: 1219–1225.

22. *Litter M.A. Armienta S.S. Farías.* IBEROARSEN Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. Editado por CYTED. (2009). ISBN: 978-84-96023-71-0

23. *Meharg, A. A.; Rahman, M.* "Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: Implications for rice contribution to arsenic consumption. Environ. Sci. Technol. (2003) 37: 229–234.

24. *Moreda–Piñeiro, Jorge; Alonso-Rodriguez, Elia; Romaris-Hortas, Vanessa; Moreda-Pineiro, Antonio; Lopez-Mahia, Purificacion; Muniategui-Lorenzo, Soledad; Prada-Rodriguez, Dario; Bermejo-Barrera, Pilar.* "Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples" Food Chemistry (2012) 130: 552–560.

25. *Moreda-Piñeiro, Jorge; Moreda-Piñeiro, Antonio; Romarís-Hortas, Vanessa; Moscoso-Pérez, Carmen; López-Mahía, Purificación; Muniategui-Lorenzo, Soledad; Bermejo-Barrera, Pilar; Prada-Rodríguez, Darío.* "In-vivo and intro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food sample". Trends in Analytical Chemistry. (2011) 30(2): 324-345.

26. *Nicolli, H.B., Suriano, J.M., Gómez Peral, M. A., Ferpozzi, L.H., and Baleani, O. H.* Groundwater contamination with arsenic and other trace-elements in an área of the Pampa, province of Córdoba, Argentina. Environ. Geol. Water Sci. (1989) 14: 3-16.

27. *O´Reilly, J., Watts, M. J., Shaw, R.A., Marcilla, A. L., and Ward, N. I.* Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina. Environ.Geochem.Health (2010) 32: 491-515.

28. *Oguri, Tomoko., Yoshinaga, Jun., Tao, Hiroaki., Nakazato, Tetsuya*. Daily intake of inorganic arsenic and some organic arsenic species of Japanese subjects. Food and Chemical Toxicology (2012) 50: 2663-2667.

29. Saipan Piyawat and Ruangwises Suthep. 2010. Probabilistic Risk Assessment of Cancer from Exposure Inorganic Arsenic in Duplicate Food by Villagers in Ronphibun, Thailand. EnvironmentAsia (2010) 3(2) 54-58.

30. *Sommella, A., Deacon, C., Norton, G., Pigna, M., Violante, A., Meharg, A.A.* Total arsenic, inorganic arsenic, and other elements concentrations in Italian rice grain varies with origin and type. Environmental Pollution (2013) 181: 38-43.

31. *Sun, Guo-Xin; Van de Wiele, Tom; Alava, Pradeep; Tack, Filip; Laing, Gijs Du.* "Arsenic in cooked rice: Effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract". Environmental Pollution (2012) 162: 241-246.

32. *Torres Escribano, Silvia; Leal, Mariana; Velez, Dinoraz; Montoro, Rosa*. "Total and Inorganic arsenic Concentrations in Rice Sold in Spain, Effect of Cooking, an00d Risk Assessments" - Environ. Sci. Technol. (2008) 42: 3867–3872.

33. *Torres-Escribano, Silvia; Denis, Sylvain; Blanquet-Diot, Stéphanie; Calatayud, Marta; Barrios, Laura, Vélez, Dinoraz; Alric, Monique; Montoro, Rosa.* "Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials Fucus sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2)". Science of the Environment (2011) 409: 604-611.

34. *Tsai, S.-M., Nai, T.-N., and Ko, Y.-C.* Cancer mortality trends in a blackfoot disease endemic community of Taiwan following wáter source replacement. J. Toxicol. Environ. Health A. (1998) 55:389-404.

35. *Tseng, C.H.* "Arsenic methylation, urinary arsenic metabolites and human diseases: current perspective". J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. (2007) 25(1): 1–22.

36. *Wong Waiky W.K., Chung Stephen W.C., Chan Benny T.P., Ho Y.Y., Xiao Ying*. "Dietary exposure to inorganic arsenic of the Hong Kong population: Results of the first Hong Kong Total Diet Study". Food and Chemical Toxicology (2013) 51: 379–385.

Rev. Toxicol (2018) 35: 18 - 21

Evaluación del reflujo en los sistemas de administración intravenosa de MP. Exposición del personal de enfermería

Costero A.M.[1]*, González A.[2], Ortuño M.A.[3], Benavent A.[4], Añón E.[1]

[1] Universitat de Valencia. The Interuniversity Research Institute for Molecular Recognition and Technological Development
[2] *Enfermero experto en administración de medicación peligrosa*
[3] *Enfermera UCI Hospital La Fe de Valencia*
[4] *Enfermera Hospital Clínico Universitario Valencia*

Resumen: Para la administración intravenosa de medicamentos peligrosos (MP), se utilizan equipos de infusión que permiten administrar varios fármacos en el mismo sistema y sirven como medida de protección para los trabajadores que los administran, pues reducen las manipulaciones del sistema de perfusión y minimizan la exposición. Se han realizado tomas de muestras de estos sistemas, y se han analizado mediante técnicas de espectrofotometría ultravioleta (UV) y espectrofotometría de fluorescencia. Se ha observado, que no evitan la contaminación de la solución de lavado que limpia el sistema antes de su desconexión y retirada. Por tanto, el sistema no debe considerarse seguro.

Palabras clave: Sistemas tipo árbol, MP, exposición, protección de los trabajadores, enfermería.

Abstract: ***Evaluation of reflux in intravenous delivery systems for hazardous drugs. Exposure of the nursing.***

Infusion kits are used to administer multiple hazardous drugs (HD's) in the same system and serve as a protective measure for workers administering them, reducing manipulations of the perfusion system and minimizing exposure.These systems have been sampled and analyzed using ultraviolet (UV) and fluorescence spectrophotometric techniques. It has been observed that they do not prevent contamination of the washing solution that cleans the system prior to disconnection and removal. The system should therefore not be regarded as safe.

Keywords: Tree system lines, hazardous drugs, exposure, health care worker protection, nurses.

Introducción

Aunque históricamente existe una división entre la seguridad del paciente y la seguridad laboral, desde un punto de vista material no existe tal separación, sino una interrelación en un entorno común y complejo.

El aumento de la incidencia de patologías como cáncer, enfermedades autoinmunes o enfermedades crónicas, en nuestra sociedad, supone a su vez el incremento en el uso de MP (MP) por parte del colectivo de enfermería. Esta situación ha hecho que el control del riesgo de contaminación sea una prioridad laboral a nivel mundial.

Según el documento de la NIOSH (2016) "List of antineoplastic and other hazardous drugs", se consideran MP para el personal sanitario, aquellos con actividad carcinógena, teratógena, genotóxica, con toxicidad sobre el proceso reproductivo o sobre un órgano concreto a dosis bajas, o nuevos medicamentos similares a otros considerados de riesgo. Los grupos de medicamentos considerados como peligrosos según la citada clasificación (NIOSH 2016) son:

-Lista 1: Medicamentos antineoplásicos.

-Lista 2: Medicamentos no antineoplásicos que cumplen con uno o más criterios NIOSH para ser considerados de riesgo.

-Lista 3: Medicamentos no antineoplásicos que tienen efectos sobre la reproducción.

*e-mail: Ana.Costero@uv.es

La exposición laboral a estos medicamentos afecta sobre todo al colectivo de profesionales de enfermería, ya que la administración de estos medicamentos es una tarea habitual, diaria y cotidiana en multitud de puestos de trabajo asistenciales de este colectivo, por lo que los profesionales podrían estar potencialmente expuestos a diferentes MP, por múltiples vías de contacto y durante muchos años a lo largo de la vida laboral.

Las vías de exposición ocupacional clásica a MP son: dérmica, inhalatoría, oral e inyección. Inicialmente se pensó que la inhalación era la principal fuente de exposición ocupacional a MP (Polovich, 2017). Los aerosoles se generan cuando se preparan los MP, lo que condujo a uso de Cabinas de Bioseguridad (CBS) a nivel mundial en los años 80. Actualmente se ha constatado que la absorción dérmica es una ruta de exposición común y es posible durante cualquier actividad en la manipulación de desconexión y retirada MP.

A principio de la década de los 90 (Mcdevitt, 1993), se identificó por primera vez la contaminación por ciclofosfamida en la superficie de las farmacias y las áreas de administración. Desde entonces, la presencia de contaminación ambiental fue reconocida como una fuente de exposición para los trabajadores de la salud que podrían absorber los residuos de MP al entrar en contacto con las superficies del lugar de trabajo contaminadas.

El residuo de MP se puede transferir a otros elementos y superficies, teniendo como consecuencia la exposición a los mismos incluso de trabajadores que no están involucrados personalmente en la manipulación de MP (Polovich, 2017). En un estudio realizado en el año 2014 (Hon et al., 2014), se tomaron muestras de las manos de trabajadores que no estaban involucrados en el manejo de MP y se encontró que tenían una exposición igual a la que tenían las enfermeras que manejaban los MP. Dicho resultado sugiere que hay un número de personal expuesto más amplio de lo que se creía en un principio.

Los residuos de MP se han encontrado en diversas superficies dentro de las cabinas de seguridad biológica (CBS), áreas de administración, fregaderos, terminales de computadores, bolígrafos, botones de ascensores, suela de los zapatos etc. (Hon, 2011). Diversos estudios han demostrado incluso contaminación de MP en la superficie externa de los viales, enviados desde la fábrica. (Mason et al., 2003).

Además, desde finales de los años 90, numerosos estudios han identificado y documentado la contaminación de las aguas residuales de los hospitales. Algunos de los MP pueden encontrarse en los sistemas de tratamiento de aguas residuales manteniendo actividad farmacológica (O´Keefe, 2017) por largos periodos de tiempo, lo que conduce a una contaminación que puede afectar al medio ambiente en general.

A pesar del creciente interés por conocer los distintos los factores que conducen a la contaminación de los MP, la mayor parte de los estudios publicados se han centrado históricamente en la preparación de los MP y no en su administración.

La ausencia de estudios sobre la contaminación en el área de administración y la presión financiera persistente sobre los sistemas de salud en toda Europa, pueden haber limitado los estudios sobre contaminación en los procesos de administración intravenosa, cuando son precisamente esos procedimientos los que generan mayor riesgo de exposición a causa de la metodología de trabajo hospitalario

realizada por los profesionales de enfermería en la actualidad (Oncology Nurse Protection, 2017).

Las técnicas tradicionales de aguja y jeringa a menudo provocan fugas. Los materiales empleados en la fabricación de los sistemas de perfusión y llaves de paso provocan contaminación. El uso de sistemas cerrados de terapia intravenosa de infusión múltiple (TIIM), aunque minimiza la exposición, no sustituye a las CBS, ni a los equipos de protección individual que se utilizan en las farmacias hospitalarias debido lógicamente a la diferente metodología de trabajo y en consecuencia de exposición laboral (Murf, 2012) lo que contribuye a incrementar el riesgo tanto en profesionales, como en pacientes y familiares de pacientes. Aunque con el tiempo se han ido incorporando medidas correctoras de este riesgo, hay pocos estudios objetivos e independientes que demuestren la eficacia y efectividad de las mismas. De hecho, en algunos casos las medidas de seguridad podrían introducir nuevos riesgos y peligros.

Precisamente por ello, el objetivo del presente trabajo es evaluar y cuantificar el reflujo en la fase de administración de la terapia intravenosa cuando se usan equipos de infusión múltiple de los denominados sistemas árbol. De este modo se han obtenido datos que han permitido acreditar la presencia o ausencia de riesgo.

Este trabajo es el primer estudio independiente que evalúa de forma paralela la estanqueidad de dos sistemas de infusión multiacceso.

Material y métodos

Para la recogida de muestras se han utilizado

- 24 Sistemas de administración de medicación intravenosa de seguridad con 4 conectores (puntos de acceso) de dos marcas comerciales disponibles en el mercado (X e Y), 12 normales y 12 sistemas modificados con un dispositivo antireflujo según patente U201431177.
- Un palo de gotero, sistemas secundarios, 24 bolsas de suero fisiológico de 50ml (lavador), 24 jeringuillas, 24 agujas, una bolsa de suero fisiológico de 100 mL.
- Rodamina 6G (Aldrich) diluida en 100 ml de suero fisiológico al 0,9 % (Grifols) con un sistema secundario (alargadera).
- 2 bombas de perfusión intravenosa, una de cada marca comercial para los sistemas empleados (X e Y).
- 24 viales para la conservación, transporte y manipulación de las muestras.

Para el análisis de las muestras se ha utilizado:

Espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-2101PC y espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse.

Sistemas de infusión y recogida de muestras.

Se procedió a la recogida de muestras con dos tipos de sistemas comerciales de administración de medicación intravenosa (X e Y).

Se trata de dos equipos de seguridad para la administración de medicación peligrosa por vía intravenosa, comercializados y utilizados actualmente, de dos marcas comerciales diferentes. Ambos disponen de cuatro válvulas para la conexión de la medicación peligrosa (puertos secundarios), una línea central con un punzón para la colocación del suero central lavador, una cámara de goteo y conexiones Luer-Lock. Los materiales de ambos equipos son similares, y sus diferencias radican fundamentalmente en el lugar de colocación de las válvulas para las conexiones secundarias.

La modificación de los sistemas consistió en añadir válvulas unidireccionales con sentidos contrarios y un sistema de recogida del reflujo. La función de estas válvulas es, que una permite lavar y otra recoger el reflujo de la mezcla con el medicamento en un sistema de recogida exclusivo para este fin, que impide que se mezcle con el suero lavador.

Los sistemas de infusión se purgaron previamente a su utilización con suero fisiológico. Se procedió a la recogida de muestras probando los dos tipos de sistemas de administración de medicación intravenosa (X e Y) y con dos modos (A y B) distintos de trabajo para verificar si existían diferencias en el reflujo en ambos modos. Por otra parte, se estudió la modificación con la incorporación de válvulas de paso unidireccional y una bolsa de recogida de los reflujos.

Modo A: Se purgaron con suero fisiológico todos los sistemas antes de acoplar el sistema secundario con el fármaco, se acopló un sistema secundario con un colorante rodamina 6G), se cerró la pinza del suero lavador y se abrió la del fármaco, se inició la infusión de la rodamina 6G para recrear lo que ocurre en la administración de medicamentos a los pacientes. Cuando terminó la infusión del fármaco, se realizó la maniobra de rellenado de la cámara de goteo cerrando la pinza del sistema secundario y abriendo la del suero lavador y el del dispositivo anti-reflujo de los sistemas modificados, se extrajo una muestra de la bolsa de suero lavador de cada uno de los sistemas con una jeringuilla y aguja nueva en cada caso, y se depositó en un vial para su posterior análisis.

Modo B: Igual al modo A, pero se detuvo la administración a mitad de la infusión y se realizó la maniobra de rellenado de la cámara de gotero, cerrando la pinza del secundario, abriendo la del suero lavador y el del dispositivo antireflujo de los sistemas modificados.

Calibración

Para elaborar la recta de calibrado se preparó una disolución patrón de rodamina 6G 10^{-4} M en solución salina fisiológica Grifols 0,9%, a partir de la cual se hicieron las correspondientes diluciones. En las mismas no se observó la aparición de ningún tipo de precipitado durante todo el tiempo de medida.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron a 520 nm y las medidas fluorimétricas a 520 nm de excitación y 550 nm de emisión.

El rango de linealidad se mantiene desde $2x10^{-6}$ hasta 10^{-5} M para las medidas colorimétricas y entre $2x10^{-7}$ y $4x10^{-6}$ para las medidas fluorimétricas.

Las muestras se midieron directamente a la concentración presente en los viales excepto en los casos en que la medida quedaba fuera del rango de linealidad, para los que fue necesario diluir en suero fisiológico.

Discusión de resultados

A pesar de que los sistemas tipo árbol o sistemas de infusión multiacceso para la administración de MP, están considerados como un dispositivo cerrado de transferencia de medicamentos (CSTD), se observar y cuantifica que en los equipos de infusión comercializados, existe reflujo de los MP desde el gotero secundario hacia la línea primaria o suero lavador (LP).

Esta situación ocurre de forma habitual, durante la terapia, al vaciarse la cámara de gotero y presionar la cámara del sistema para volver a ser llenado. Es en ese momento cuando se produce el reflujo del MP, y por tanto el suero lavador queda contaminado.

Los resultados obtenidos tanto utilizando la técnica de ultravioleta como la de fluorescencia indican que en los dos sistemas comerciales que se han estudiado se produce un reflujo que varía desde 2 a más de 30 ppm de rodamina 6G, tal y como se observa en la figura 1. Es interesante indicar, que en el caso del dispositivo de la marca X, las variaciones observadas entre el modo A y el modo B son pequeñas, siendo la contaminación en el modo A ligeramente inferior que en el modo B. En el caso del dispositivo Y, el cambio de modo de trabajo produce una gran variación en la extensión de la contaminación. Dicha contaminación, en el caso del modo B, es más de 15 veces superior a la observada en el modo A.

Por otra parte, se ha comprobado que la contaminación producida en

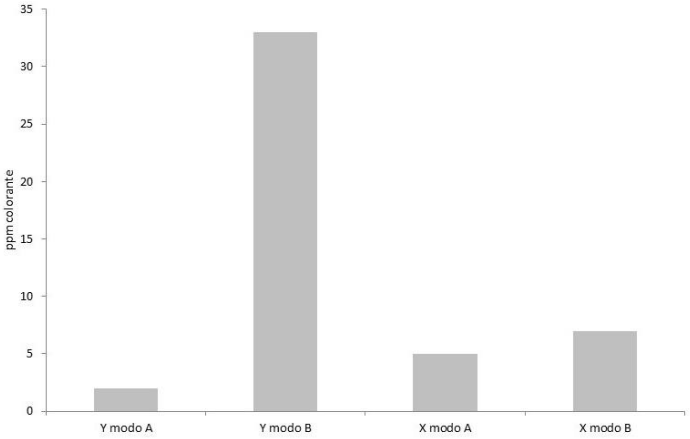

Figura 1: Estudio comparativo de los sistemas comerciales en los distintos modos de operación.

el caso emplear el dispositivo X en el modo A, es más del doble que la observada al emplear el dispositivo Y utilizando el mismo procedimiento. Teniendo en cuenta los datos obtenidos, el método de trabajo A es más seguro que el B, y bajo estas condiciones experimentales el dispositivo Y es más seguro que el X.

Los datos comentados anteriormente ponen de manifiesto que, en cualquier modo de trabajo, los dispositivos comerciales producen siempre contaminación. Esta contaminación se genera de forma habitual, durante la terapia, al vaciarse la cámara de gotero y presionar la cámara del sistema para volver a ser llenado. Es en ese momento cuando se produce el reflujo del MP, y por tanto el suero lavador queda contaminado. Con el fin de evitar este problema se ha planteado utilizar una modificación en los sistemas convencionales que queda reflejada en la Figura 2.

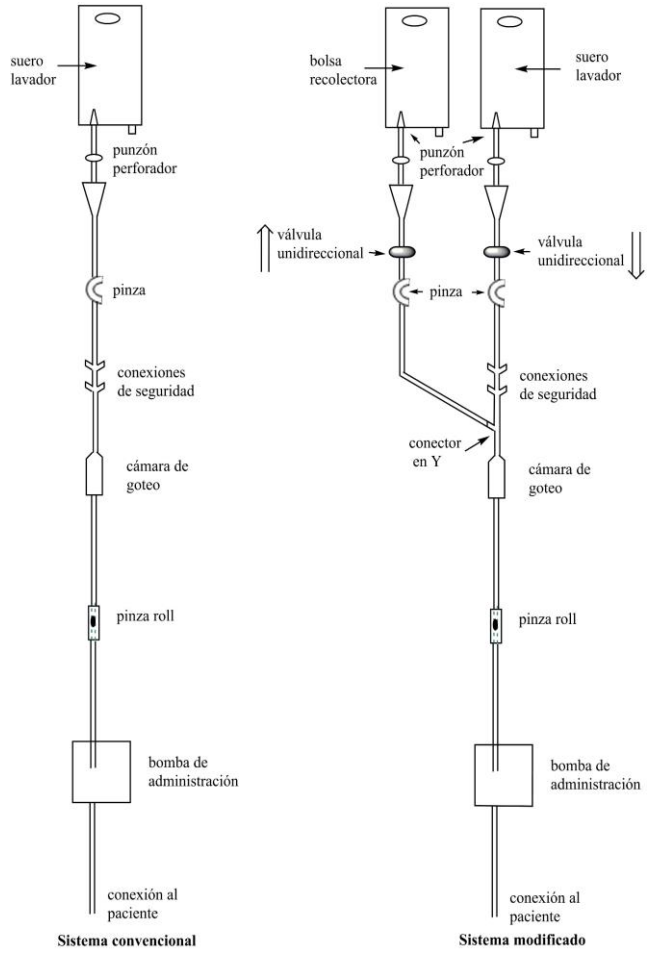

Figura 2: Esquema de la modificación de los sistemas convencionales.

La modificación incorpora al sistema convencional una válvula unidireccional situada justo debajo del punzón perforador del suero central lavador, que solo permite el paso de suero limpio de la bolsa hacia el sistema evitando que refluyan a esta los MP. Además, incluye también un conector tipo "y" por el que se conecta es sistema al dispositivo anti-reflujo que costa de una bolsa vacía para recogida de aire y restos de fármaco, un punzón perforador, una válvula unidireccional que permite el paso desde el sistema hacia la bolsa recolectora, una pinza tipo clamp y tubuladora con conector de seguridad.

El funcionamiento del sistema modificado para realizar la maniobra de rellenado es el mismo que en los sistemas convencionales, es decir, abrir la pinza de la línea principal y la del dispositivo anti-reflujo y comprimir la cámara de goteo. De este modo, por medio de las válvulas unidireccionales se redirige el aire y restos de fármaco hacia la bolsa recolectora, evitando que refluyan a la bolsa de suero limpio y consiguiendo a su desconexión y retirada que el sistema quede libre de fármacos evitando la contaminación.

Los resultados obtenidos con el sistema modificado claramente indican que la contaminación tanto en el sistema X como en el Y se ve disminuida hasta valores inferiores a 5 ppm (Figura 3).

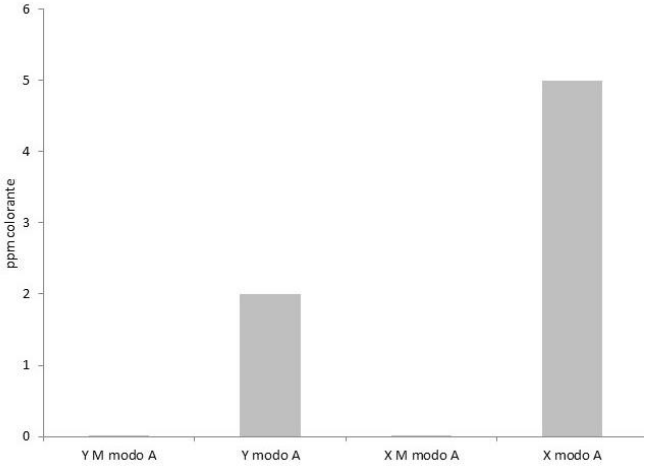

Figura 3: Estudio comparativo de los sistemas comerciales X e Y, y dichos sistemas modificados (trabajando en todos los casos en el modo A).

Según los datos obtenidos en el presente estudio, se demuestra que aunque los sistemas tipo árbol, pueden evitar el contacto con MP durante la conexión, al finalizar el tratamiento, el sistema pasa de ser un sistema cerrado a ser un sistema abierto por donde puede haber salida de líquido remanente en el sistema. Si el suero lavador está contaminado, el sistema puede ceder suero contaminado en el momento de la desconexión.

Conclusiones

Las pruebas practicadas, acreditan que en equipos convencionales, existe reflujo de líquido desde el sistema secundario al suero central lavador, con el peligro que ello supone en el proceso de desconexión.

La misma prueba practicada en un equipo de infusión modificado con válvulas anti-reflujo (VA), demuestra que prácticamente se elimina la contaminación desde el suero secundario al suero principal. Ello es posible colocando estratégicamente las válvulas antirreflujo y una bolsa vacía que recogería el reflujo producido al presionar la cámara, evitando así la contaminación del suero lavador por lo tanto eliminando la fuente de exposición.

Agradecimientos

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo y financiación de las pruebas de laboratorio por el Consejo de Enfermería de la Comunidad

Valenciana (CECOVA) y el Colegio de Enfermería de Valencia.

Todo el material utilizado para la recogida de muestras, sistemas, bombas de infusión, suero, etc., ha sido donado o prestado por dos marcas que comercializan los sistemas.

Bibliografía

1. *Fahimi F, Sefidani A, Taghikhani S, Saliminejad L*. The rate of physicochemical incompatibilities, administration errors. Factors correlating with nurses errors. Iranian J. Pharm. Res. 2015; 14(S): 87-93.
2. Guardino X. NTP: 1051. Exposición laboral a compuestos citostáticos: sistemas seguros para su preparación. Instituto Nacional de Seguridad e higiene en el trabajo. 2015. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT).
3. *Hon CY, Teschke K, Chua P, Venners S, Nakashima L, Venners S*. Occupational exposure to antineoplastic drugs: identification of job categories potentially exposed throughout the hospital medication system. Safe. Health Work. 2011; 2:273-281.
4. *Hon CY, Teschke K, Demers PA, Venners S*. Antineoplastic drug contamination on the hands of employees working throughout the hospital medication system. J Occ. Med. 2014; 58:761-770.
5. *Mason HJ, Morton J, Garfitt SJ, Iqbal S, Jones K*. Cytotoxic drug contamination on the outside of vials delivered to a pharmacy. Annals Occ. Hyg. 2003; 47: 681-5.
6. *Mcdevitt JJ, Lees PS, McDiarmid MA*. Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents. J. Occ. Med. 1993, 35:57-60.
7. *Müller C*. ¿Wie genau ist die Dosierung?. Pharma. Zeit. 1997, 142(11):879.
8. *Murf SJ*. Principal engineering controls. En: Government editor. Safety and health handbook for cytotoxic drugs. Lanham, Mariland 2012.p 231-232-
9. NIOSH. Performance test protocol for closed system transfer devices used during pharmacy compounding and administration of hazardous drugs. 2015 [acceso: 25 de noviembre de 2017]. Disponible en: www.cddc.gov/.../performancetestprotocolclosedsystemtrans
10. NIOSH. List of Antineoplastic and other hazardous Drugs in Healthcare Settings. 2016 [acceso 15 de octubre de 2017]. Disponible en: https://www.cdc.gov/niosh/.../hazardous-drugs-list_2016-161.pdf.
11. NIOSH. Exposición a drogas peligrosas. 2017 [acceso: 27 de noviembre de 2017].Disponible en: www.cdc.gov/niosh/topics/hazdrug/default.html.
12. O´Keefe TL. Cytotoxic drug contamination in hospital and municipal wastewater and its transfer to surface water. Pharma-Cycle Inc. 2011 [acceso: 20 de noviembre del 2017]. Disponible en: www.jaaha.org/doi/abs/10.5326/JAAHA-MS-6471.
13. Oncology Nurse Protection Is it time for more precise legislation on exposure to hazardous drugs? Mind. Res. 2017. http://www.mindmetreresearch.com/wp-content/uploads/2017/02/MindMetre-Oncology-Nurse-Protection-Report-February-2017.pdf
14. *Polovich M.A.* Eye-Oponer. Understanding invisible Hazardous Drug Exposure. Oncology Nursing New; 2017 [acceso: 14 de octubre de 2017]. Disponible en: www.oncnursingnews.com/.../eye-opener-understanding-invisible-hazardous-drug-exposure.

Efecto del neonicotinoide - tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)

García, K.Y.[1]*, Salazar, M.[1], García, J.E.[1]

[1] *Universidad del Quindío, Grupo de Investigación en Biología y Educación (BIOEDUQ)*

Resumen: El pez cebra ha surgido como la mejor opción para ensayos toxicológicos, ofrece ventajas marcadas como un modelo de desarrollo de vertebrados y permite comprender las dinámicas de diversas sustancias tóxicas. Actualmente se ha encontrado una creciente preocupación por el uso de plaguicidas neonicotinoides y los posibles efectos ecológicos y ecotoxicológicos sobre los polinizadores y los invertebrados, y los efectos indirectos en ecosistemas acuáticos. El objetivo principal fue evaluar las alteraciones fenotípicas desde huevo hasta el periodo larval del pez cebra (*Danio rerio*) (6 días aproximadamente) relacionadas con tres dosis (0,48µg/ml, 0,90µg/ml, 1,30µg/ml) de plaguicida Neonicotinoide (tiametoxam). Para esto se usaron cuatro repeticiones, cada repetición con veinte huevos. Se realizó un diseño de bloques al azar evaluando la tasa de mortalidad y una descripción macroscópica de las alteraciones provocadas por este plaguicida, se encontraron alteraciones como: cifosis, lordosis, edema pericárdico, edema del saco vitelino, hipertrofia en las aletas y una ralentización en el desarrollo, la mayor tasa la presentó el tratamiento 3 (1,30µg/ml), demostrando que el neonicotinoide tiametoxam es tóxico y letal para el pez cebra.

Palabras clave: insecticida; neonicotinoides; pez cebra; alteraciones; toxicología.

Abstract: ***Effect of neonicotinoid - thiamethoxam in the zebrafish (Danio rerio) embryonic development.***

Zebrafish has emerged as the best choice for toxicological testing, present marked advantages as a model of vertebrate development and allows to understand the dynamics of various toxic substances. There has been growing concern over the use of neonicotinoid pesticides and possible ecological and ecotoxicological effects on pollinators and invertebrates, and indirect effects on aquatic ecosystems. The objective was to evaluate phenotypic alterations from egg to larval period of zebrafish (*Danio rerio*) (6 days approximately) related to three doses (0,48µg/ml, 0,90µg/ml, 1,30µg/ml) of the pesticide Neonicotinoid (Thiamethoxam), for this, four replicates were used, each repetition with twenty eggs. A randomized block design was performed evaluating the mortality rate and a macroscopic description of the alterations caused by this pesticide, alterations were found such as: kyphosis, lordosis, pericardial edema, yolk sac edema, fins hypertrophy and a slowdown in development, demonstrating a higher mortality rate in the treatment with higher concentration (1,30µg/ml). The neonicotinoid thiamethoxam that proved to be toxic and lethal to the zebrafish.

Keywords: toxicology; alterations; zebrafish; neonicotinoid; insecticide.

Introducción

Los insecticidas son uno de los principales contaminantes del medio ambiente. Su capacidad de biocumulación y bioampliación hace que persistan mucho tiempo en el ambiente. Aunque juegan un papel importante al proteger los cultivos de plagas, representan grandes amenazas para la salud de los seres humanos y de los organismos distintos a los diana (Taparia et al., 2014).

Los neonicotinoides son una familia de insecticidas que actúan en el sistema nervioso central de los insectos. Son una clase relativamente nueva de insecticidas derivados de la nicotina. Debido a su alta neurotoxicidad para los insectos, los neonicotinoides son muy eficaces en el control de ciertas plagas. Aplicados como tratamientos foliares, en gránulos en el suelo o como recubrimiento de semillas, se ha convertido en una de las clases de insecticidas más utilizados en agricultura. Se utilizan en plantas de maíz, en árboles frutales y en muchos otros cultivos. Tienen propiedades sistémicas, lo que significa que son absorbidos por la totalidad del sistema vascular de la planta, por lo que todas las partes de las plantas en crecimiento contienen residuos de los plaguicidas, incluso el polen y el néctar (Gómez, 2013).

El perfil ambiental de esta clase de insecticidas indica que son persistentes, tienen alto potencial de lixiviación y escorrentía, y son altamente tóxicos para una amplia gama de invertebrados. Por lo tanto, los neonicotinoides representan un riesgo significativo para las aguas superficiales y la diversidad de fauna acuática y terrestre que sustentan estos ecosistemas (Morrissey et al., 2015).

Son activos a dosis muy pequeñas, y según la dosis, la inactivación del sistema nervioso puede provocar la muerte de los individuos afectados, directamente, o una serie de trastornos como descoordinación, parálisis, pérdidas del sentido de la orientación, de la eficacia del vuelo y de la termorregulación (Gómez, 2013).

Los impactos ecológicos de insecticidas o productos químicos en el ambiente se pueden estudiar mediante el uso de modelos biológicos sensibles. El pez cebra (Danio rerio) se ha convertido en un organismo modelo ampliamente utilizado en estudios ecotoxicológicos (Hill et al., 2005). Las numerosas ventajas que presenta el pez cebra para evaluar cualquier tipo de sustancia están dadas por: i) desarrollo embrionario externo lo que permite el manejo de los embriones sin perjudicar a los peces adultos. ii) los embriones y las larvas son transparentes por lo tanto facilita al investigador la observación de los diferentes órganos, con la ayuda de una lupa o de un estereomicroscopio. iii) tiempo corto de desarrollo (72 h); alcanzan la madurez sexual a los 3 - 4 meses. iv) son fértiles todo el año, lo cual proporciona una gran capacidad reproductiva. v) una hembra es capaz de colocar cientos de huevos por semana, esto permite disponer de una gran cantidad de individuos. vi) finalmente existe un gran conocimiento sobre su biología, y su genoma está totalmente secuenciado (Moreno, 2013). Además de esto, el pez cebra es muy utilizado como modelo para la comprensión de la biología del desarrollo en los vertebrados, además, de presentar una alta conservación en la función de genes entre este y el humano (Clark y Ekker, 2015. La importancia del pez cebra se ha determinado porque muchos de los fenotipos de los mutantes se han encontrado en el humano, aportando un poderoso instrumento para profundizar en las patologías humanas (Báez y col, 2004).

El tiametoxam se usa en cultivos de mango, es un insecticida sistémico de la familia de los neonicotinoides con actividad por contacto e ingestión. Es considerado una sustancia moderadamente tóxica con gran espectro de actividad insecticida. Para Apis mellifera es tóxica y dañino para organismos acuáticos y edáficos. Es utilizado para el control de larvas come hojas y para impedir que los insectos se alimenten de éstas. El control se realiza especialmente para insectos que atacan cultivos de mango cítricos, arroz, trigo, algodón, aceitunas, coliflor, etc., alimentos de un alto consumo a nivel mundial (Sinhay y Thaker, 2014); organismos entre los que se destacan: Aphididae, Thysanoptera, Coleoptera, Chilopoda, Diplopoda, Symphyta e Isoptera, interviene a nivel estomacal por el consumo de las hojas con residuos del insecticida y por contacto directo con el mismo. Actúa, al igual que otros neonicotinoides, interfiriendo en la transmisión nerviosa al unirse a receptores nicotínicos de acetilcolina (Syngenta, 2015).

*e-mail: kygarciab@uqvirtual.edu.co

En estudios realizados con ratones y conejos se ha demostrado que los neonicotinoides afecta el desarrollo y la calidad de los embriones de preimplantación y muestra embriotoxicidad incluso a dosis agudas (Babeľová et al., 2017), aunque se espera que los insecticidas neonicotinoides tengan una influencia dañina en los mamíferos, hay pocos datos experimentales en animales para apoyar el efecto y los mecanismos, Yoneda et al., (2018) realizaron un estudio con ratones macho, donde aplicaron distintas dosis de dinotefurano y realizaron análisis conductuales, en una prueba de campo abierto, la actividad locomotora total se incrementó de una manera dependiente de la dosis, estos resultados sugieren que la exposición a dinotefurano en ratones machos causa hiperactividad, dado que la acetilcolina causa la liberación de dopamina, los neonicotinoides pueden conferir un riesgo de trastornos del desarrollo a través de una alteración en los sistemas de monoaminas.

A pesar de que en la Unión Europea en el 2018 se firmó la resolución para la prohibición de neonicotinoides, en países de América, incluido Colombia, se siguen aplicando cada vez más a medida que se reduce el uso de los insecticidas organosfosforados. Considerando que los neonicotinoides son perjudiciales para las abejas, persisten varios años en el suelo y el agua, lo que constituye un peligro para los ecosistemas, se debe evitar el uso indebido o ilegal de estas sustancias, con una legislación de uso general para el control de estos insecticidas y buscar alternativas para el control de insectos.

Por tanto, es imprescindible conocer acerca de la toxicología ambiental, la cual analiza los efectos de los contaminantes, evaluando la naturaleza de estos y las dosis que afectan, ya sea de manera toxica o nociva a los diferentes niveles estructurales de los seres vivos (Alvarez, 2011). La evaluación de insecticidas es de gran importancia, ya que permite conocer las alteraciones físicas que experimenta dichos organismos ante un contaminante. Los resultados obtenidos servirán como apoyo para futuras evaluaciones de los efectos toxicológicos de los plaguicidas en los diferentes estadios del desarrollo de poblaciones diferentes a los diana, que están en contacto con estos químicos, además, servirá como un medio de información a los agricultores sobre los efectos de estos insecticidas y su proceso de contaminación en cuerpos de agua.

El presente estudio se diseñó para identificar los efectos morfológicos y la tasa de mortalidad inducidos por tiametoxam en tres concentraciones, en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Material y métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio BIOEDUQ, el cual cuenta con una humedad relativa que oscila entre 68% y 80% y una temperatura promedio que oscila entre los 18°C y 25°C. Los huevos embrionados fueron donados por el Laboratorio de Biología del Desarrollo y el Laboratorio de Neurociencias y Ritmos Circadianos de la Universidad de los Andes.

Sustancia química

Tiametoxam 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4iliden(nitro) amina, extracto puro fue donado por el Laboratorio de Plaguicidas y Salud de la Universidad del Quindío. Las soluciones de ensayo se realizaron a partir de una solución stock que contenía 1mg de tiametoxam en 100 ml de agua destilada para una concentración final de 10µg/ml, a partir de esta concentración stock se obtuvo las tres diferentes soluciones experimentales que consistía en: solución al 0,48µg/ml (5 ml de solución stock en 100 ml de agua destilada), solución al 0,90µg/ml (10 ml de solución stock en 100 ml de agua destilada) y solución al 1,30µg/ml (15 ml de solución stock en 100 ml de agua destilada).

Proceso experimental

El proceso experimental se desarrolló de la siguiente manera: se utilizaron tres tratamientos (0,48µg/ml; 0,90µg/ml y 1,30µg/ml) más el grupo control, en cada uno se realizaron cuatro repeticiones, 20 huevos para cada repetición, es decir 80 huevos por tratamiento, para un total de 320 huevos para todo el proceso experimental.

Se realizó una evaluación de huevos de pez cebra y se removieron los huevos no fertilizados, muertos o con presencia de hongo, para evitar daños en el proceso. Los huevos fertilizados con 10 hpf (horas post fertilización), se ubicaron en cajas Petri con las diferentes concentraciones anteriormente mencionadas realizando una renovación diaria de soluciones para mantener las concentraciones apropiadas. La exposición de insecticida se evaluó hasta las 144 horas (6 días aproximadamente). La observación del desarrollo de pez cebra se realizó directamente en la caja Petri usando para ello un microscopio óptico con cámara digital marca Zeiss, se realizó una descripción y un registro fotográfico de las alteraciones encontradas en huevos y larvas.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño de bloques completos al azar. La variable de respuesta fue la tasa de mortalidad, se utilizó el paquete estadístico Statistix 8.0. Además de esto se realizó una tabla según el nivel de afectación de las alteraciones encontradas en cada uno de los tratamientos.

Resultados y discusión

Tasa de mortalidad

Según el análisis de varianza bajo el diseño de bloques al azar, se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla 1). Al realizar la prueba LSD (Least significant difference) de comparación de medias, el tratamiento tres (1,30µg/ml) presentó la mayor tasa de mortalidad con respecto a los tratamientos uno y dos (0,48µg/ml y 0,90µg/ml).

Tabla 1. *Análisis de varianza bajo un diseño de bloques al azar*

Tratamiento	Concentraciones	Medias en %	Error estándar
1	0,48µg/ml	48,75	±0,0584
2	0,90µg/ml	51,25	±0,0584
3	1,30µg/ml	71,25*	±0,0584
4	Control	0	±0,0584

**De acuerdo con el valor de p = 0000, el tratamiento tres (1,30µg/ml) presentó la mayor tasa de mortalidad con respecto a los tratamientos uno y dos (0,48µg/ml y 0,90µg/ml). El grupo control no presentó mortalidad. El error estándar fue de ±0,0584.*

Los estudios realizados sobre los efectos de los insecticidas en el desarrollo embrionario del pez cebra han demostrado que estos afectan la sobrevivencia. En este estudio, se utilizaron tres dosis y se determinó una relación directa entre dosis y mortalidad. La mortalidad observada en los tres tratamientos indica según el análisis de varianza, que existen diferencias altamente significativas, se observó que la dosis de 1,30µg/ml presentó la mayor tasa de mortalidad con un valor de 71,25 superando el 50% de la población, lo cual demuestra que el tiametoxam presenta una alta toxicidad en las etapas de desarrollo embrionario que puede ser considerado como efectos letales a la exposición a corto plazo. El tiempo estimado de sobrevivencia de los embriones fue aproximadamente 8 días en cada uno de los tratamientos.

Los ambientes acuáticos están siendo constantemente contaminados debido a la descarga de efluentes agrícolas, industriales o domésticos que amenazan la existencia de organismos; entre estos contaminantes, se encuentran los insecticidas procedentes de la fumigación de productos agrícolas, como un factor principal de la pérdida de la biodiversidad en los ecosistemas (Zhang et al., 2017). Durante las últimas 2 décadas, una nueva clase de insecticidas, los neonicotinoides, se encuentra entre las cinco principales clases químicas de insecticidas en el mercado mundial (Jeschke y Nauen, 2008; Jeschke y Nauen, 2011; Tomizawa y Casida, 2011; Casida y

Durkin, 2013). El amplio uso de insecticidas neonicotinoides ha causado preocupación por sus efectos en los organismos no objetivo, la alta solubilidad en agua, junto con su amplio uso en el paisaje, coloca a los medios acuáticos en alto riesgo de contaminación a través de eventos de escorrentía.

Dada la frecuencia de detección de los neonicotinoides en los sistemas acuáticos, estudios recientes han explorado los potenciales efectos letales y subletales de los neonicotinoides en especies acuáticas (Pisa et al., 2015; Anderson et al., 2015). Además, de sus efectos sobre la mortalidad, los neonicotinoides han demostrado reducir la movilidad, las tasas de alimentación, fecundidad, desarrollo y crecimiento en organismos acuáticos (Alexander et al., 2008; Colombo et al., 2013).

Alteraciones morfológicas

El pez cebra (Danio rerio), es una alternativa para estos tipos de estudios, ya que presenta un menor consumo de tiempo y un menor costo de mantenimiento de acuerdo con otros tipos de modelos. Su uso como un modelo para el estudio de la toxicidad en el desarrollo embrionario ha ido en aumento de manera constante. Asimismo, el pez cebra ha demostrado ser un modelo predictivo para la evaluación de los efectos teratogénicos y neurotóxicos de muchas sustancias conocidas (McGrath y Li, 2008).

Los embriones de pez cebra (Danio rerio) expuestos a 0,48µg/ml de tiametoxam presentaron alteraciones morfológicas, que se empezaron a evidenciar en el proceso de eclosión del embrión, aproximadamente entre las 72 y 120 h, encontrándose: lordosis leve con un ángulo de 90° y 145°, lordosis severa con ángulo de 17°, edema pericárdico, lordosis media, edema del saco vitelino e hipertrofia de la aleta caudal (Figura 1). En la figura 1D, se observa el área del edema pericárdico que fue de 0,075 mm^2.

Figura 1: A. Embrión con desarrollo normal (control). **B.** Embrión de 5 dpf (días post- fertilización expuesto al 0,48µg/ml de tiametoxam, con una leve lordosis (L) con ángulo de 90° y Edema pericárdico (EP) **C.** Embrión de 4 dpf expuesto al 0,48µg/ml de tiametoxam con una lordosis severa (L) y edema pericárdico (EP). **D.** Embrión de 5dpf expuesto al 0,48µg/ml de tiametoxam con lordosis leve (L), Edema pericárdico, edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (HA).

Los embriones de pez cebra (Danio rerio) expuestos a 0,90µg/ml de tiametoxam presentaron mayores alteraciones a nivel óseo, como: lordosis y cifosis (Figura 2), hipertrofia en aleta caudal (Figuras 2C) y enrollamiento total del cuerpo (Figura 2G). Igualmente se encontraron alteraciones a nivel cardiaco como edema pericárdico (Figuras 2D y 2F) y edema del saco vitelino (Figura 2F).

La toxicidad de los neonicotinoides en el desarrollo embrionario del pez cebra no se ha estudiado ampliamente, sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo han sido relacionados con estudios en otras sustancias, donde han reportado alteraciones similares en columna vertebral entre las que se encuentra lordosis, cifosis y enrollamiento total del cuerpo (Figura 2B, 2C y 2G), como lo encontrado por DeMicco et al., (2009), que demostraron que los piretroides en el desarrollo embrionario del pez cebra son ligeramente teratógenos a dosis muy altas, causando deformación en el eje del cuerpo.

Los embriones de pez cebra (Danio rerio) expuestos a 1,30µg/ml de

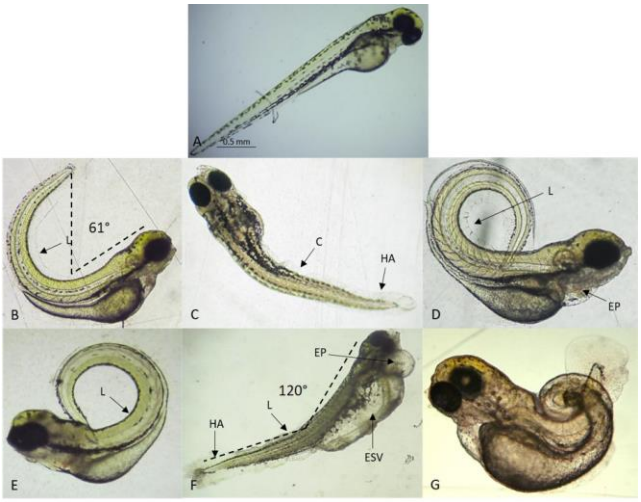

Figura 2: A. Embrión con desarrollo normal (control). **B.** Embrión de 5 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con lordosis leve (L). **C.** Embrión de 4 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con cifosis leve (C), hipertrofia en la aleta caudal (HA). **D.** Embrión de 4 dpf expuesto al 0,90µg/ml , y edema pericárdico leve (EP). **E.** Embrión de 5 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con lordosis severa (L). **F.** Embrión de 5 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con lordosis leve (L), edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (HA). **G**. Embrión de 4 dpf con un enrollamiento total del cuerpo.

tiametoxam, presentaron mayor número de alteraciones a nivel cardiaco que se pudo evidenciar a las primeras horas de la eclosión entre las 72 h hasta las 144 h (Figura 3), la mayoría de embriones mostraron una lordosis severa con un ángulo de 30° (Figura 3C), edema de saco vitelino e hipertrofia de la aleta caudal (Figura 3D y 3E). Igualmente se registró una malformación en la notocorda (Figura 3E). La totalidad de estas alteraciones oseas se lograron observar en las primeras horas de eclosión aproximadamente entre 96 y 120 h. En este tratamiento el edema pericárdico se presentó en mayor ocurrencia y en mayor tamaño con un área desde 0,42 mm^2 hasta 0,54 mm^2.

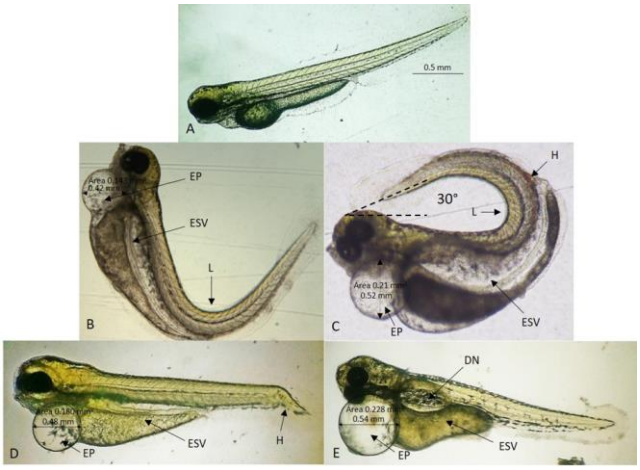

Figura 3: A. Embrión con desarrollo normal (control). **B.** Embrión de 5 dpf expuesto al 1,30µg/ml de tiametoxam con lordosis (L), edema pericárdico (EP) y edema del saco vitelino (ESV). **C.** Embrión de 4 dpf expuesto al 1,30µg/ml con lordosis severa (L) con ángulo de 30°, edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) y hemorragia en la parte superior a la aleta caudal (H). **D.** Embrión de 5 dpf expuesto al 1,30µg/ml de tiametoxam con edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (H). **E.** Embrión de 6 dpf expuesto al 1,30µg/ml con daños en la parte superior de la notocorda (DN), edema pericárdico (EP) y edema del saco vitelino (ESV).

Se plantea que las alteraciones como el edema pericárdico y el edema del saco vitelino pueden ser causados por la súperhidratación del órgano afectado, debido a problemas de la regulación osmótica derivados de la acumulación del insecticida (Hollert et al., 2003; Hallare et al., 2005; Cook et al., 2005). Se puede inferir que el tiametoxam pudo haber inducido significativamente alteraciones cardiovasculares en embriones de pez cebra.

En la concentración 0, 48µg / ml de tiametoxam se logró observar

Tabla 2. *Niveles de afectación en cada una de las alteraciones encontradas por tratamientos.*

Alteraciones	T1	T2	T3
Lordosis*	+ +[+]	+++ [+++]	+++ [+++]
Cifosis	-	+	-
Edema pericárdico	+	+	++
Edema del saco vitelino	+	+	+
Hipertrofia de aletas	+	+	+
Enrollamiento del cuerpo	-	+	-
Hemorragia	-	-	+
Daños en notocorda	-	-	+
Coagulación del huevo	+	+	-
Huevos sin eclosionar	+	+	+

*Niveles de afectación en cuanto a número de individuos. Leve (+) Media (++) Severa (+++) (n = 80 embriones). *Lordosis. Niveles de afectación según el ángulo. Leve [+], ángulo de 90° a 170° de cabeza a cola comparado al control que tiene un ángulo de 180°. Media [++], ángulo de 80° a 30° de cabeza a cola. Severa [+++], ángulo menor de 30° de cabeza a cola*

embriones de 6 dpf con deterioro total del cuerpo y alteración ósea (Figura 4E). También se observó la no eclosión de embriones en la concentración de 0,90µg/ml, varios embriones duraban dentro del corion hasta los 6 dpf (Figura 4D), en la concentración de 1,30µg/ml de Tiametoxam se encontró una coagulación del embrión, ésta generalmente se presentó 24 h después de agregar el tratamiento (Figura 4C), en esta misma concentración se observaron varios embriones que no terminaban el proceso de eclosión y conservaron el corión alrededor de la cabeza hasta los 8 dpf (Figura 4D y 4F).

Figura 4: A. Embrión con desarrollo normal (control). **B.** Huevo embrionado con desarrollo normal (control). **C.** Huevo embrionado con 2 dpf expuesto al 1,30µg/ml presenta una coagulación del embrión y una invasión por vorticella. **D.** Embrión con 6 dpf expuesto a 0,90µg/ml, sin eclosionar. **E.** Embrión con 6 dpf expuesto al 0,48µg/ml, mostrando un alto grado de toxicidad. **F.** Embrión con 4 dpf expuesto al 1,30µg/ml, sin terminar el periodo eclosión.

Las primeras etapas de vida del pez cebra pueden ser más sensibles a las sustancias tóxicas que en los peces adultos (Fishman, 2001; Sun et al., 2006; Vitor et al., 2010), se ha demostrado que las altas concentraciones de insecticidas pueden atravesar el corion y causar múltiples efectos teratogénicos e incluso causar la muerte en embriones de peces. Esto puede ser debido a la rápida absorción del insecticida, que pasa a través de los poros de la membrana del corión produciendo daños a los embriones en desarrollo, como los hallados en esta investigación; también, se encontraron efectos similares en embriones de pez cebra expuestos a otros tipos de insecticida como: cipermetrina, bifentrina, clorpirifós, trifluzamida y fipronil, los cuales producen lesiones y muertes de larvas, encontrando anormalidades como: edema pericárdico, eje del cuerpo curvo, apoptosis en las células del sistema nervioso, movimientos espontáneos anormales, inhibición de la eclosión, ritmo cardiaco lento degeneración de notocorda, entre otras. (Stehr et al., 2006; Jin et al., 2009; Shi et al., 2011; Yang et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Las anormalidades en la columna vertebral y del esqueleto observadas en los embriones en los tres tratamientos están en concordancia con lo reportado por Bomma et al., (2016), donde utilizaron toxafeno y otros insecticidas organoclorados, organofosforados y neonicotinoides y hallaron alteraciones óseas como lordosis y cifosis en peces Pimephales promelas.

Los cambios morfológicos observados como la coagulación del huevo y la no eclosión de embriones han sido utilizados como criterios de valoración toxicológicos, como los encontrados en el presente trabajo, donde estas alteraciones se presentaron en menor número, además estos cambios han sido reportados por Bai et al., (2016) donde menciona que estas variaciones son definidas como letales, subletales, teratogénicas, cuando son provenientes de insecticidas.

Comparación de los tratamientos con las alteraciones

En la tabla 2 se observa los niveles de afectación con los tratamientos. La alteración con mayor ocurrencia fue la lordosis presentando un nivel medio en el tratamiento uno (0,48µg/ml) es decir más del 40% y menos del 80% de los individuos presentaron esta alteración. En cuanto a los tratamientos dos y tres (0,90µg/ml y 1,30µg/ml) con un nivel severo, más del 80% de individuos presentó esta alteración. Según el ángulo de cabeza a cola, en el tratamiento uno (0,48µg/ml) se identificó un nivel de afectación leve, es decir, la mayoría de individuos tuvieron un ángulo de 90° a 170° de cabeza a cola comparado con el control el cual presentó un ángulo de 180°. Los tratamientos dos y tres (0,90µg/ml y 1,30µg/ml) exhibieron un nivel de afectación severo, la mayoría de individuos con un ángulo menor de 30° de cabeza a cola con respecto al control.

Para el caso de edema pericárdico el tratamiento 1,30µg/ml presentó un nivel de afectación medio, más del 40% de los individuos mostraron este tipo de alteración, mientras que en los otros dos tratamientos los niveles de afectación fueron leves, menos de 40% de los individuos. En otras alteraciones como cifosis, edema del saco vitelino, hipertrofia de aletas, enrollamiento del cuerpo, hemorragia, daños en notocorda, coagulación del huevo y huevos sin eclosionar se presentaron de forma leve en los tratamientos, es decir menos del 40% de los individuos registraron estos tipos de alteraciones.

El pez cebra se usa comúnmente para modelar enfermedades humanas usando modificaciones genéticas; sus aplicaciones incluyen estudios de corazón, riñón, hígado, hematopoyético, inmunológico y otros sistemas. De manera similar, se puede usar para modelar los efectos en la salud de las exposiciones ambientales para comprender mejor las etiologías y los mecanismos de las enfermedades relacionadas con el ambiente en los seres humanos. Desde hace varios años ha aumentado la preocupación por la persistencia de compuestos químicos en el medio ambiente, así como los efectos agudos y a largo plazo de la exposición a tóxicos ambientales y contaminantes; el pez cebra proporciona un modelo ideal para estudiar estos efectos. Los productos químicos pueden simplemente agregarse al medio embrionario y el pez y transparente puede ser evaluado en busca de letalidad y anomalías del desarrollo a partir de la fertilización hasta las etapas larvarias. White et al., 2008).

La capacidad de observar los efectos de las toxinas in vivo permite la evaluación directa de la toxicidad, así como las medidas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. El pez cebra se ha utilizado

para estudiar los compuestos que van desde metales y metaloides de origen natural hasta componentes sintéticos de productos de consumo, pesticidas, subproductos de procesamiento industrial e incineración de desechos. El pez cebra también es fácilmente susceptible para pruebas de toxicidad, y para investigaciones sobre los mecanismos de acción de productos farmacéuticos y sustancias tóxicas. El modelo de pez cebra brinda la oportunidad de combinar el poder de la toxicología rápida y la capacidad de estudiar la asociación de exposiciones con resultados a largo plazo en un vertebrado, convirtiéndolo en un sistema complementario e invaluable para la investigación en ecotoxicología (Bambino y Chu, 2017).

Conclusiones

El pez cebra es un excelente sistema de modelo animal para estudiar los efectos toxicológicos del neonicotinoide tiametoxam. La tasa de mortalidad fue directamente proporcional a la concentración de tiametoxam. Entre más alta la concentración, más alta la mortalidad de embriones. Las alteraciones morfológicas más frecuentes fueron: lordosis, edema pericárdico, edema del saco vitelino e hipertrofias en aletas. Las menos frecuentes fueron; enrollamiento del cuerpo, hemorragia y daños en notocorda. El neonicotinoide tiametoxam que demostró ser tóxico y letal para el pez cebra.

Agradecimientos

A la Universidad del Quindío, Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, las Doctoras Zayra Viviana Garavito y Verónica Akle de la Universidad de los Andes, al Laboratorio de investigación en Biología y Educación (BIOEDUQ), al almacén de materiales y reactivos de biología de la Universidad del Quindío, al museo de artrópodos de la Universidad del Quindío (MAUQ) y al Laboratorio de Plaguicidas y Salud de la Universidad del Quindío.

Bibliografía

1. *Alexander AC, Heard KS, Culp JM.* Emergent body size of mayfly survivors. Freshw Biol 2008; 53, 171-180.
2. *Álvarez C.* Efectos teratógenos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra Danio rerio (Halmiton, 1822) a cinto dosis subletales (Trabajo de pregrado) Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá D.C, 2011.
3. *Anderson JC, Dubetz C, Palace PV*. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. Sci total Environ 2015; 505, 409-422.
4. *Báez OA, Prieto F, Galán CA.* Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra (Danio rerio) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). Ensayos en cortos plazos. AquaTIC 2005; 21, 62 – 70.
5. *Bai H, Kong W, Shao C, Li Y, Zhang L, Min L, Guan F, Wang C*. Zebrafish embryo toxicity microscale model for Ichthyotoxicity evaluation of marine natural products. Mar Biotechnol 2016; 18, 264-270.
6. *Babeľová J, Šefčíková Z, Čikoš Š, Špirková A, Kovaříková V, Koppel J, Makarevich AV, Chrenek P, Fabian D*. Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. Toxicology 2017; 392, 71-80.
7. *Bambino K, Chu J*. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. Curr Top Dev Biol. 2017; 124, 331-367.
8. *Bomma Y, Rajesh P, Venkateswara R*. Toxicomorphomics and toxicokinetics of quinalphos on embryonic development of zebrafish (Danio rerio) and its binding affinity towards hatching enzyme, ZHE1. Aquat Toxicol 2016; 180, 155-163.
9. *Casida JE, Durkin KA*. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. Annu Rev Entomol 2013; 58, 99-117.
10. *Clark KJ, Ekker SC.* How Zebrafish Genetics Informs Human Biology. Nature Edu 2015; 8, 3.
11. *Colombo V, Mohr S, Berghahn R, Pettigrove VJ.* Structural changes in a macrozoobenthos assemblage after imidacloprid pulses in aquatic field-based microcosms. Arch Environ Contam Toxicol 2013; 65, 683-692.
12. *Cook LW, Paradise CJ, Lom B*. The Pesticide Malathion Reduces Survival and Growth in Developing Zebrafish, 2005.
13. *DeMicco A, Cooper KR, Richardson JR, White LA.* Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. Toxicol Sci 2009; 113, 177-186.
14. *Fishman MC.* Genomics-zebrafish-the canonical vertebrate. Science 2001; 294, 1290- 1291.
15. *Gómez, A.* Neonicotinoides versus abejas. Consultores apícolas, asistencia técnica y formación. Castellón, España, 2013.
16. *Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Köhler HR, Triebskom R.* Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with Zebrafish (Danio rerio) embryos. Sci Total Environ 2005; 347, 254-271.
17. *Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE*. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci 2005; 86, 6-19.
18. *Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T*. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using Zebrafish (Danio rerio) embryos. J Soils Sediments 2003; 3, 197-207.
19. *Jeschke P, Nauen R.* Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. Pest Manag Sci 2008; 64, 1084-1098.
20. *Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A*. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. J Agric Food Chem 2011; 59, 2897-2908.
21. *Jin M, Zhang X, Wang L, Huang C, Zhang Y, Zhao M*. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. Aquat Toxicol 2009; 95, 347-354.
22. *McGrath P, Li CQ*. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. Drug Discovery Today 2008; 13, 394-401.
23. *Moreno M.* Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (Danio rerio). Universidad del País Vasco, 2013.
24. *Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sánchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro M, Liber K.* Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. Environ Int 2015; 74, 291-303.
25. *Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, y col.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ Sci Pollut Res Int 2015; 22, 68-102.
26. *Sinhay S. y Thaker AM.* Study on the impact of lead acetate pollutant on immunotoxicity produced by thiamethoxam pesticide. Indian J Pharmacol. 2014; 46, 596 – 600.
27. *Shi X, Aihua G, Guixiang J, Yuan L, Jing D, Jing J, Fan H, Long Y, y col.* Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. Chemosphere 2011; 85, 1010-1016.
28. *Stehr CM, Linbo TL, Incardona JP, Scholz NL*. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. Toxicol Sci 2006; 92, 270-278.

29. *Sun ZH, Jia SJ, Meng AM.* Zebrafish swimming in life sciences. Chin Bull Life Sci 2006; 18, 431-436.

30. Syngenta. Tiametoxam, insecticida granulado dispersable 2015. www.syngenta.com.co. Consultado el día 12 de febrero de 2017.

31. *Taparia N, Mathur L, Shahani L*. Toxic action of quinalphos 25% ec (flash), an organophosphate insecticide in induction of skeletal malformations in the embryos of Gallus domesticus. World J Pharm Pharm Sci 2014; 3, 2078-2088.

32. *Tomizawa M, Casida JE.* Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. J Agric Food Chem 2011, 59, 2883-2886.

33. *Vitor V, Joana A, Marisa S, Vitor R.* Effects of marine toxins on reproduction and early stages development of aquatic organisms. Mar Drugs 2010; 8, 59-79.

34. *White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, et al.* Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. Cell Stem Cell 2008; 2, 183–189.

35. *Yang Y, Qi S, Wang D, Wang K, Zhu L, Chai T, Wang C.* Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (Danio rerio). J Hazard Mater 2016; 307, 127-136.

36. *Yoneda N, Takada T, Hirano T, Yanai S, Yamamoto A, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Tabuchi, Y, Hoshi N.* Peripubertal exposure to the neonicotinoid pesticide dinotefuran affects dopaminergic neurons and causes hyperactivity in male mice. J Vet Med Sci. 2018; 4, 634–637.

37. *Zhang J, Liu L, Ren L, Feng W, Peng L, Wu W, Yan Y.* The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (Danio rerio) earlylife stages. J Hazard Mater 2017; 334, 121-131.

Rev. Toxicol (2018) 35: 28 - 32

Cálculo de ingesta de cafeína en estudiantes de etapa escolar y de educación superior de San Salvador de Jujuy, Argentina

Castro, B.V; Escalera, A.R; Romero, A.E; Ávila Carreras, N.M.E. *

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy. Alberdi N° 47, San Salvador de Jujuy. CP: 4600.

Resumen: La cafeína es una de las sustancias psicoactivas más consumidas en todo el mundo; se encuentra presente en chocolates, bebidas colas, bebidas energéticas, café e infusiones, actúa sobre el sistema nervioso central. Su consumo elevado puede provocar irritabilidad, palpitaciones, temblores y convulsiones. El objetivo del trabajo ha sido determinar y comparar las ID de cafeína de niños de etapa escolar y estudiantes de educación superior de San Salvador de Jujuy, para establecer el nivel de exposición, a partir de la cuantificación de cafeína en los alimentos más consumidos en ambos grupos. Se realizaron 240 encuestas en 6 escuelas primarias y 4 instituciones de nivel superior, para conocer la ingesta de cafeína y las principales fuentes de cafeína. Se realizó la determinación de cafeína en bebidas de cola, de chocolate, e infusiones (té, mate, mate cebado y café) de las marcas más consumidas y disponibles en los supermercados, la extracción se realizó con cloroformo y la determinación analítica mediante espectrofotométrica U.V – visible." Las ingestas diarias se calcularon, considerando los volúmenes de bebidas e infusiones consumidas, los pesos corporales de cada niño y joven-adulto encuestado y la concentración de cafeína aportados por los alimentos. Las bebidas colas presentaron concentraciones de cafeína entre 0,03 y 0,19 mg/L; las infusiones de 0,15-0,67 "mg/L"; las chocolatadas 0,03-0,06"mg/L"; el mate cebado 0,67"mg/L"; bebidas energéticas 0,35"mg/L". Las IDEt promedio en mg/día en las niñas fueron de 321,71"mg/L"; en los niños de 314,7"mg/L"; en jóvenes adultas de 420 "mg/L" y jóvenes adultos de 379,8"mg/L". El promedio de IDEt (mg/Kg pc/día) para niños fue de 7,07 "mg/L" y para adultos de 6,4"mg/L". Se concluye que la población infantil presenta una ID de cafeína mayor a los adultos y los posiciona como consumidores moderados a altos de cafeína. El té fue el principal contribuyente de cafeína en ambas poblaciones.

Palabras claves: cafeína; Niños; Adultos; Estudiantes, Ingestas diarias.

Abstract: ***Calculation of caffeine intake in students of school and higher education in San Salvador de Jujuy, Argentina.***

Caffeine is one of the most consumed psychoactive substances in the world; It is present in chocolates, cola drinks, energy drinks, coffee and infusions, acts on the central nervous system. Its high consumption can cause irritability, palpitations, tremors and convulsions. The aim of this study was to determine and compare the caffeine ID of school children and higher education students of San Salvador de Jujuy, to establish the level of exposure, from the quantification of caffeine in the foods most consumed in both groups. 240 surveys were conducted in 6 primary schools and 4 institutions of higher level, to know the intake of caffeine and the main sources of caffeine. The determination of caffeine in cola beverages, chocolate, and infusions (tea, mate, mate cebado and coffee) of the brands most consumed and available in supermarkets, the extraction was made with chloroform and the analytical determination by UV spectrophotometry - visible. ".The daily intakes were calculated, taking into account the volumes of beverages and infusions consumed, the body weights of each child and young adult surveyed and the concentration of caffeine provided by the food. The cola drinks presented caffeine concentrations between 0.03 and 0.19 mg / L; the infusions of 0.15-0.67 "mg / L"; chocolate bars 0.03-0.06 "mg / L"; the primed mate 0.67 "mg / L"; energy drinks 0.35 "mg / L". The mean IDEt in mg / day in girls was 321.71 "mg / L"; in children 314.7 "mg / L"; in young adults of 420 "mg / L" and young adults of 379.8 "mg / L". The average IDEt (mg / Kg pc / day) for children was 7.07 "mg / L" and for adults 6.4 "mg / L". It is concluded that the infant population has a higher caffeine ID than adults and positions them as moderate to high caffeine consumers. Tea was the main contributor of caffeine in both populations.

Keywords: Caffeine; Children; Adults; Students; Daily Ingestions**.**

Introducción

La cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) es un alcaloide natural perteneciente al grupo de las metilxantinas (Calle Aznar S., 2011). Está presente naturalmente en una gran cantidad de plantas tales como *Coffea arabica, Coffea robusta, Thea sinensis, Theobroma cacao, Cola acuminata, Ilex paraguayensis* y *Paullinia cupana* (Bardoni y col. 2015). La cafeína se distribuye en cantidades variadas en semilla, hoja y fruto y se encuentra en mayor proporción en las plantas más jóvenes. En dichos vegetales, ésta metilxantina constituye un mecanismo de defensa, que actúa como un tóxico natural que protege a la planta del ataque de insectos que se alimentan de ellas (Calle Aznar S., 2011). También pueden contener otros alcaloides xantínicos, incluyendo los estimulantes cardiacos teofilina y teobromina, así como otras sustancias que junto a la cafeína pueden formar complejos insolubles, como los polifenoles (Calle Aznar S., 2011).

La cafeína es catalogada como un estimulante menor de acuerdo a la clasificación de drogas adictivas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que excita la actividad del Sistema Nervioso Central (S.N.C). Los efectos manifestados en el organismo están sujetos a factores intrínsecos (estado fisiológico, edad, género, entre otros) y extrínsecos (como la ingesta diaria). En dosis bajas la cafeína puede provocar sensaciones de bienestar, mejora la concentración, aumenta la excitación y significativamente la vigilia, reduce la fatiga (Temple J., 2009; Díaz Herrera L. et al., 2012), facilita la ejecución de tareas monótonas, mejora la coordinación corporal, reduce el tiempo de reacción, la memoria a corto plazo y reduce el riesgo de "fallos cognitivos" (Glade M. et al., 2010). También, mejora discretamente la función respiratoria al aumentar la contractibilidad del diafragma (Pardo Lozano R. et al., 2007; Carpintero Salvador N. et al., 2014), estimula la actividad de la vesícula biliar, relaja la musculatura lisa de las vías biliares y disminuye los niveles de colesterol en la bilis, e incrementa la secreción acida gástrica y de enzimas digestivas como la pepsina (Pardo Lozano R. et al., 2007), provoca un aumento del metabolismo debido al estímulo de la lipólisis (Glade M. et al., 2010). Sin embargo, cuando se administran cantidades mayores (dosis > 400 mg/día) puede producir síntomas negativos como, inquietud, nerviosismo, ansiedad, temblores, insomnio, enrojecimiento de la piel, diuresis y problemas gastrointestinales (Smith A., 2002). Es un vasodilatador a nivel periférico y vasoconstrictor en la circulación cerebral (Bardoni et al., 2015), puede reducir la incorporación de calcio, provocando pérdida de hueso o el riesgo de fractura (Nawrot P.et al., 2003). También puede provocar una disminución de la motilidad de espermatozoides y aumento del porcentaje de espermatozoides muertos (Nawrot P. et al., 2003). A dosis ≥ 500 mg de cafeína/día se pueden manifestar taquicardia, arritmias como contracciones ventriculares prematuras en personas sensibles (Nawrot P. et al., 2003). En los niños el consumo de concentraciones ≥ 300 mg de cafeína/día pueden alterar la conducta, manifestando síntomas de ansiedad y nerviosismo (Temple J. et al., 2009), produciendo además desordenes del sueño.

*e-mail: avila.carreras@gmail.com

El presente trabajo busca determinar las ingestas diarias de cafeína de niños en etapa escolar y estudiantes de nivel superior de San Salvador de Jujuy, para establecer el nivel de exposición y comparar los resultados obtenidos con los encontrados en la literatura; a partir de la cuantificación de cafeína en los alimentos más consumidos en ambos grupos.

Material y métodos

Población de Estudio

El trabajo se realizó en la ciudad de San Salvador de Jujuy, con una población de 263.296 habitantes que cuenta con 66 escuelas de nivel primario, 7 establecimientos de educación terciaria y 3 universidades. Para el estudio se trabajó con 240 estudiantes de ambos sexos, niños de 11 a 12 años, de 6 escuelas primarias de gestión pública y privada 3 de barrios y 3 céntricas; y jóvenes adultos de 18 a 35 años, de 2 instituciones terciarias y 2 universitarias (gestión pública y privada). Para conocer el consumo de cafeína de ambos grupos, se recurrió a encuestas adaptadas para cada población. Los participantes debieron completar una encuesta semi-cerrada sobre el consumo semanal (en porciones) de bebidas que contienen cafeína (café, té, mate, bebidas cola, bebidas energéticas, entre otras), además de otros datos de interés como edad y peso (en el caso de los niños el peso fue tomado *in situ*). A partir de estas encuestas se obtuvieron las marcas de los diferentes alimentos líquidos en estudio; se analizaron 4 bebidas colas (2 marcas internacionales y 2 marcas nacionales), 1 marca de bebida energética, té, café, 1 marca de yerba mate usada para la preparación de mate cebado y otra de mate en saquito para mate cocido y 2 marcas de chocolatadas.

De las encuestas se obtuvo, para cada participante, datos del consumo diario de cada bebida e infusión en unidad de volumen (mL). La ingesta diaria de cafeína (en mg) se calculó multiplicando el consumo diario (en mL) de cada bebida por el contenido medio de cafeína de cada bebida (mg/mL) y sumando los aportes de todas las bebidas. Esta ingesta se expresó en mg/día y en mg/kg pc/día. Para la evaluación de los resultados se consideraron para cada grupo (niños y adultos) la ingesta promedio.

Tratamiento de las muestras

Las muestras como café (instantáneo), té, mate, chocolatadas fueron preparadas según las instrucciones de los rótulos. Se colocó la muestra en una taza de 250 mL y se agregó agua caliente (96ºC) y se dejó reposar 5 min. En el caso del mate cebado, se preparó vertiendo agua caliente (70-80ºC) en un recipiente con yerba mate, luego se trasvasó el contenido mediante filtración a un vaso de precipitado, esta operación se repitió 10 veces. En el caso de las bebidas colas, las muestras se des-gasificaron mediante agitación, utilizando varilla de vidrio y a baño María.

Soluciones estándar

Se preparó una solución madre de cafeína en cloroformo para una concentración final de 1 mg/mL, a partir de la cual se prepararon soluciones patrones de 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,0312 mg/mL; 0,0156 mg/mL; 0,0078 mg/mL; 0,0039 mg/mL; 0,00195 mg/mL, las que fueron empleadas como puntos para realizar la recta de calibrado. Como blanco se utilizó cloroformo.

Cuantificación de cafeína en las muestras líquidas

Se tomó 10 mL de la muestra y se llevó a una ampolla de decantación. Se agregó 5 mL de solución de Permanganato de Potasio al 1,5 %, se mezcló y se dejó reposar por 10 min, posteriormente se agregó 10 mL de solución reductora (se prepara disolviendo 5 g de Sulfito de Sodio y 5 g de Sulfocianuro de Potasio, en 100 mL de agua destilada) y se volvió a mezclar. Se prosiguió con la adición de 1 mL de solución de ácido fosfórico diluido al 15%, se homogeneizó y por último se incorporó 1 mL de solución de Hidróxido de Sodio al 25% mezclando nuevamente la solución.

Para la extracción de cafeína en fase acuosa se utilizó cloroformo. La primera extracción se realizó con 50 mL de solvente agitando vigorosamente por 1 min. Se dejó separar las 2 fases y se recogió la porción clorofórmica en un matraz de 100 mL. Luego se realizó una segunda extracción con 40 mL de Cloroformo recolectando los extractos en el matraz obteniéndose un volumen final de 100 mL (A.O.A.C. 2005). Finalmente se realizó la lectura en espectrofotómetro UV – Visible a una longitud de onda de 276,5 nm utilizándose cloroformo como blanco.

Estudio de dietas totales (EDT)

Para el estudio de Dieta Total se utilizó el método de duplicación de raciones, que consiste en el análisis de una réplica de la ración diaria ingerida por los participantes. Este estudio es especialmente útil cuando se trata de estudiar la ingesta de contaminantes o nutrientes muy concretos en grupos especiales de población (González-Moreno M. et al., 2006). Para estimar la ingesta total de cafeína en las dietas de las poblaciones estudiadas, es preciso conocer los alimentos más consumidos por las poblaciones en estudio que aportan cafeína y el nivel de consumo diario de cada alimento y el volumen de las porciones.

- La ingesta diaria total de cafeína se calculó con la siguiente fórmula:

$$IDEt = [\overline{\chi_{\Sigma AC}} * pc * R]/PC$$

IDEt= Ingesta diaria estimada total de cafeína

$X_{\sum AC}$= promedio (mg.g^{-1}) de cafeína en todos los alimentos consumidos en el día.

pc= porción consumida (g)

R= Repeticiones de la porción consumida

PC= Peso corporal (kg)

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Info-stat software (versión del estudiante; Córdoba, Argentina). Se realizó prueba de análisis de varianzas (ANOVA) Factorial entre sujetos.

Resultados

Datos Analíticos

La ecuación de regresión lineal obtenida fue y = 40,891.x + 0,0216, con un coeficiente de correlación de R^2 = 0,9995. El límite de detección (LD) fue de 0,0002 mg/mL y el límite de cuantificación (LC) de 0,0008 mg/mL.

Cuantificación de cafeína en los alimentos seleccionados según la dieta

La Tabla 1 detalla las concentraciones cuantificadas de cafeína, en las bebidas más consumidas por la población en estudio. A partir de estos datos se calculó la ingesta diaria de cafeína por alimento y la ingesta diaria total de cada niño y joven adulto encuestado.

Ingestas diarias de cafeína por alimento.

Las figuras 1 y 2, muestran las Ingestas Diarias de cafeína de bebidas colas y desayuno (incluye infusiones y chocolatadas), expresados en mg/día para cada una de las instituciones estudiadas tanto de la población infantil como en la adulta respectivamente.

Ésta población recibe el mayor aporte diario de cafeína a partir del desayuno liquido, especialmente de las infusiones (té, mate en saquito); con un aporte entre 125,9 mg/día y 267,1 mg/día. En segundo lugar se encuentran las bebidas colas con un rango de aporte de 77,3 a 169,3 mg/día de cafeína.

Los resultados obtenidos mediante ANOVA Factorial entre sujetos por Género para la bebidas e infusiones muestran que no se observan

Tabla 1. *Concentración de cafeína en alimentos líquidos y los mg aportados por ración.*

Alimentos líquidos	Ración (ml)	Cafeína		
		mg/ ración	mg/mL	DS (mg/mL)
Café "instantáneo"	250	57,5	0,23	0,006
Té "Saquitos"	250	167,5	0,67	0,065
Mate "Saquitos"	250	37,5	0,15	0,021
Mate Cebado	250	167,5	0,67	0,25
Chocolatada 1	250	15	0,06	0,006
Chocolatada 2	250	7,5	0,03	0,000
Bebida Cola 1	220	41,8	0,19	0,012
Bebida Cola 2	220	41,8	0,19	0,000
Bebida Cola 3	220	6,6	0,03	0,000
Bebida Cola 4	220	28,6	0,13	0,020
Bebida Energizante	250	87,5	0,35	0,162

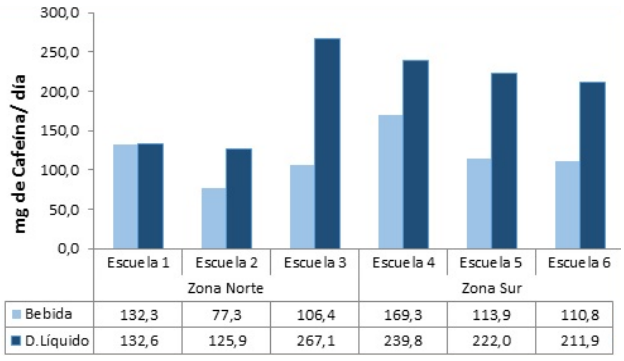

Figura 1: Ingestas Diarias de cafeína en Bebidas cola y desayuno líquido, en Niños.

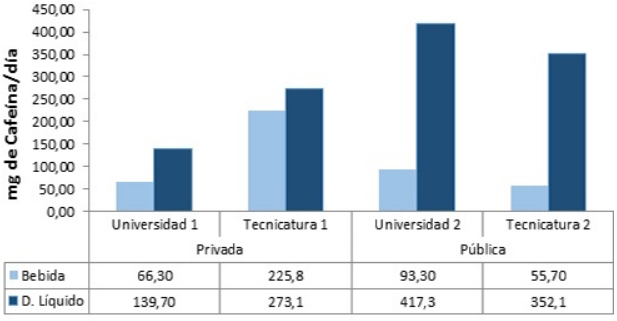

Figura 2: Ingestas Diarias de cafeína en Bebidas cola y desayuno líquido, en Adultos.

diferencias significativas *p = 0,5027* y *p= 0,3817* respectivamente. Este mismo análisis estadístico fue realizado por Escuela, hallandose diferencias significativas unicamente en las infusiones *(p= 0,0014)*. Diferencia que tambien se indicó al analizar los resultados según gestión pública o privada *(p= <0,0001)*.

Los jóvenes adultos estudiantes universitarios tienen el mayor aporte diario de cafeína a partir de las infusiones (té y mate cebado), alcanzando un consumo de 139,70 a 417,3mg/día de cafeína. Las bebidas colas se presentan como segundo contribuyente diario con un rango de 55,70 a 225,8 mg/ día de cafeína.

Los resultados obtenidos mediante ANOVA Factorial entre sujeto por Género para las bebidas e infusiones, no mostraron diferencias significativas *p = 0,7889 y p= 0,4828* respectivamente. El mismo análisis estadístico fue realizado entre Instituciónes de Nivel Superior, hallandose diferencias significativas solo en las infusiones con un *p= <0,0001*.

Ingesta Diaria Estimada Total de cafeína

En las figuras 3 y 4 se muestran la Ingesta Diaria Estimada Total (IDEt) de cafeína de cada población estudiada; cabe señalar que en este cálculo se incluye a todos los alimentos y la cantidad de veces que son consumidos en el día.

Figura 3: Ingestas Diarias Total expresado en mg/ día, de Niños y Adultos de cada Institución.

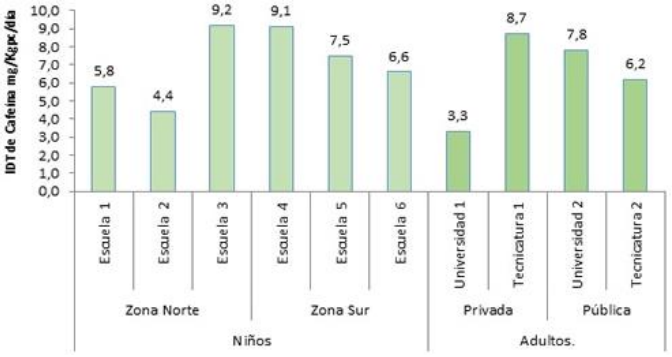

Figura 4: Ingestas Diarias Total expresado en mg de cafeína / Kg pc/ día de Niños y

En relación a las distintas estratificaciones realizadas para analizar, se puede observar que las instituciones de la Zona Sur poseen los mayores niveles de exposición dentro de la población infantil. Con respecto a la población adulta, los estudiantes de las Instituciones Públicas son quienes presentan mayores ingestas diarias de cafeína.

Los resultados de IDEt en niños fueron evaluados estadísticamente, el análisis realizado por género, por escuela y por gestión (pública y privada), indicó que no existen diferencias significativas en las ingestas diarias totales al obtenerse valores de p> 0,05 (p= 0,4129; p=0,1062 y p= 0,1289 respectivamente).

En los resultados de IDEt para los adultos, se encontró diferencias significativas en el análisis por género *p= 0,0111* y por Institución *p=0,0002*.

Para estudiar si existen diferencias significativas entre ambas poblaciones (infantil y adulta), se analizaron los resultados con ANOVA factorial entre sujeto, este análisis mostró un *p= 0,0004*, indicando que si existen diferencias significativas entre las IDEt consumidas por ambas poblaciones (niños y adultos).

La IDEt en relación al peso corporal muestra que la población infantil presenta el mayor nivel de exposición a la cafeína, indicando márgenes de ingesta de 4,4 a 9,2 mg/Kg pc/día; mientras que los adultos poseen una ingesta mínima de 3,3 mg/Kg pc/día y máxima de 8,7 mg/Kg pc/día. Las figuras N° 5 y 6 muestran los promedios calculados en las IDEt expresadas en mg/día y mg/Kg pc/día (respectivamente) en ambas poblaciones diferenciadas por género.

Los resultados se analizaron con ANOVA factorial por género entre niñas y mujeres adultas no mostraron diferencias significativas *p= 0,2928*. El mismo análisis se realizó entre niños y adultos donde sí se observó diferencias significativas entre ellos, *p = 0,0001*.

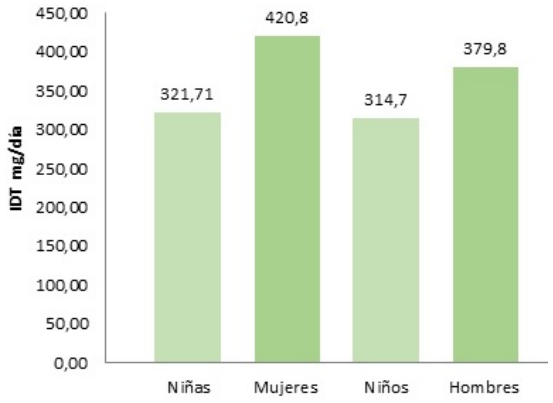

Figura 5: Ingestas Diarias Total en mg/día promedio de Niños y Adultos por género.

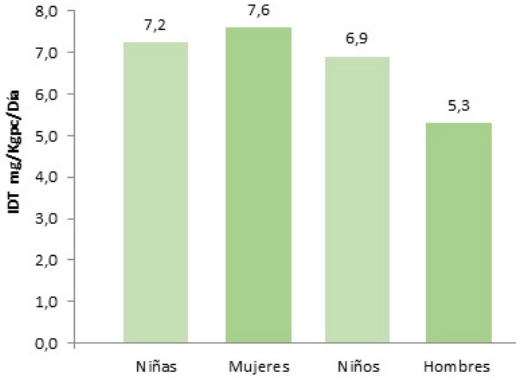

Figura 6: Comparación de Ingesta Diaria Total en mg/Kg pc/día entre Niñas y Mujeres Adultas y Niños y Hombres Adultos.

Discusión

De los alimentos analizados, el té es el que posee mayor concentración de cafeína, encontrándose por arriba a lo reportado en la provincia de Buenos Aires con valores entre 0,12 y 0,27 mg/mL, por otro lado, el mate en saquito y el mate cebado presentaron concentraciones similares a las obtenidas en dicha provincia (0,15 a 0,33 mg/mL), mientras que el café se encuentra dentro de los valores informados en ese mismo estudio entre 0,22 a 1,38 mg/mL (Olmos et al., 2009). De las bebidas colas la numero 2 es la más consumidas por ambas poblaciones estudiadas, presentando concentraciones similares a la bibliografía antes mencionada. Las bebidas energéticas resultaron ser un alimento poco consumido, por lo tanto, no es un aportante de cafeína significativo en la dieta.

En San Salvador de Jujuy, se observó que los principales aportes de cafeína en la dieta de jóvenes estudiantes entre 18 a 35 años de edad, son el té, el mate cebado y las bebidas colas. Los resultados indican que esta población se encuentra dentro de la categoría de consumidores moderados a altos de cafeína (300 a > 400 mg/día), con una ingesta mayor a España donde aproximadamente el 80% de la población adulta, tiene una ingesta diaria promedio de 2-3 tazas de café (Pardo Lozano et al., 2007) equivalentes a 200 – 300 mg/día.

Los resultados de las ingestas diarias en este trabajo de investigación, se encuentran por arriba de las obtenidas en España (1 mg/Kg pc/día), Reino Unido (4 mg/Kg pc/día), Australia (1,3 mg/Kg pc/día), Canadá (7 mg/Kg pc/día), Dinamarca, (4,5-6,5 mg/Kg pc/día), Argentina (4,4 mg/Kg pc/día) y Estados Unidos (3 mg/Kg pc/día) ([2]Nawrot P. et al., 2003). Sin embargo, se encuentran próximos a las IDEt de algunos países europeos de 200-300 mg/día (Pardo Lozano et al., 2007).

En esta investigación los adultos presentan una exposición a la cafeína inferior a la encontrada para niños. Los resultados de IDEt de adultos en este trabajo superan a las halladas por Bardoni et al., (2015), quien estudio las ingestas en la provincia de Buenos Aires hallando valores de 300 mg/día y en Brasil con ingestas diarias de 288 mg/día. En Argentina Carnevali de Falke y Degrossi (2015) estudio las IDEt en base a bebidas energéticas en hombres y mujeres entre 18 a 40 años, mostrando que la Ingesta Diaria media Total de cafeína en hombres supera el doble al de las mujeres, con un valor promedio de 21,3 mg/día, sin embargo, esta es una bebida de consumo habitual en las grandes ciudades, mientras que en provincias como Jujuy el aporte de cafeína en la dieta a través de estas bebidas no es significativa debido a su bajo consumo. Cabe mencionar, que no existen muchos estudios de cálculos de ingestas totales en Argentina lo que dificulta la discusión de los resultados obtenidos en este estudio.

En los estudios encontrados en la bibliografía reciente se ha visto que los principales contribuyentes de este psicoactivo son los refrescos y chocolates. Un estudio realizado a adolescente entre 12 a 20 años de edad en la ciudad de Santo Tome – Santa Fe Argentina, indica que el aporte de cafeína a través de infusiones resulta ser igual para varones como para mujeres, con un promedio aproximado de 288 mg/día (Cúneo, Florencia y Schaab Noelia, 2013), siendo estos valores menores a los obtenidos en esta investigación.

De acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, la población infantil recibe el mayor aporte de cafeína a partir de té y mate. Esto se debe a que en las escuelas públicas los niños reciben desayunos y meriendas, siendo sus principales componentes el té y los mates cocidos. Se observa que los niños que asisten a escuelas de gestión privada, presentan dietas más variadas, incorporando leche chocolatadas, que aportan menores concentraciones de cafeína a la dieta en comparación con el té y el mate. En la ciudad de Buenos Aires (Argentina) la ingesta media de cafeína en los niños menores de 10 años es de 35 mg/día, siendo los refrescos la fuente principal. Los niños de entre 11 y 15 años tienen una ingesta media de 120 mg/día, siendo el mate el principal responsable de dichas ingestas de cafeína (Olmos V. et al., 2009).

Los niños encuestados en este trabajo no consumen bebidas energéticas, a diferencia de estudios realizados en otros países como Republica Checa donde se observa que el consumo de estas bebidas es común en niños, encontrando valores de IDEt entre los 23 a 90 mg/día, de los cuales entre 4 y 43 mg/día son aportados por estas bebidas.

Analizando los resultados por género vemos que en las niñas las IDEt promedio fue mayor que en los niños. La ingestión de 35 mg/kg pc/día puede llevar a una toxicidad moderada a alta en la población infantil, debido a que la cafeína se metaboliza de forma más lenta en los niños (Díaz Herrera L. et al., 2012). En función a los resultados obtenidos en este estudio, la población infantil representada por niños de 11 a 12 años de edad supera las registradas en estudios realizados en países como España (1 mg/Kg pc/día), Reino Unido (<3 mg/Kg pc/día), Dinamarca (<2,5 mg/Kg pc/día), Canadá (1,2 mg/Kg pc/día) ([1]Olmos V. et al., 2009; [2]Nawrot P. et al., 2003), incluso las obtenidas en Buenos Aires, Argentina ([1]Olmos V. et al., 2009). Por lo tanto, la población infantil estudiada en este trabajo son considerados consumidores moderados a altos de cafeína por presentar una IDEt > 300 mg/día.

Por otro lado, se observó que tanto las mujeres como las niñas presentaron IDEt mayores a los hombres y niños. Sin embargo, el promedio de las ingestas diarias calculadas en la población infantil (ambos sexos) fue superior a las informadas para los adultos de ambos sexos. Los resultados fueron obtenidos de encuestas realizadas en estación invernal, donde las infusiones calientes como el té y el mate (cocido y cebado), fueron los principales componentes de las dietas, además que son los que presentan las mayores concentraciones de cafeína encontradas en los alimentos estudiados.

Estos primeros resultados, revelan la necesidad de profundizar las investigaciones sobre la exposición a la cafeína por medio de la dieta.

Además, resulta necesario iniciar educación alimentaria en ambas poblaciones, principalmente en la infantil.

Conclusión

De los alimentos analizados los que presentan mayor concentración de cafeína son el té, el mate cebado y el mate cocido.

La IDEt promedio calculadas para la población infantil indicó mayor exposición a la cafeína respecto a los adultos. Ambas poblaciones pueden considerarse como consumidores moderados a altos de cafeína.

Bibliografía

1. A.O.A.C. official Method 925.17 "Caffeine in tea Modified Bailey- Andrew Method". AOAC 18th Edition, 2005.
2. *Bardoni N, Contartese C M, Olmos, V*. "Evaluación de la ingesta diaria de cafeína en niños y adolescentes de Argentina". Acta Toxicol. Argent. 2015; 23 (1), 5-14.
3. *Calle Aznar S y Rojo Riós A.* Características de los productos comerciales. En: Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales. Escolad' Enginyeria de Barcelona Est - E. T. Industrial, especialitat en Química Industrial]. Barcelona; 2011 [acceso 15 de noviembre de 2016]. Disponible en: http://hdl.handle.net/2099.1/11148.
4. *Carnevali de Falke S y Degrossi M C.* Bebidas energizantes: características de consumo e ingesta de cafeína en adultos jóvenes en Argentina Acta Toxicol. Argent. 2015; 23 (3), 105-117.
5. *Carpintero Salvador, N.y Salazar Enríquez, M. E*. Evaluación del efecto anticelulítico de una formulación cosmética a base de extracto alcohólico foliar de Guayusa, Ilex guayusa Loes (Aquifoliaceae). Quito, Universidad Politécnica Salesiana. Maestría en Ciencias y Tecnología Cosmética. 2014; 17- 18.
6. *Cúneo, F y Schaab N.* Hábitos de consumo de bebidas en adolescentes y su impacto en la dieta. Diaeta (Buenos Aires). 2013; 31(142), 34-41
7. *Díaz Herrera L ., Rincón Cárdenas D., Uribe Las prilla L., Santacruz Ortega M. D. P*. Efectos de la cafeína en la retención de un aprendizaje espacial inicial y en la adquisición de nueva información en ratones machos y hembras. Tesis Doctoral, Universidad de la Sabana. 2012. 6 – 24.
8. *Feferbaum R, de Abreu L C, Leone C.* Fluid intake patterns: an epidemiological study among children and adolescents in Brazil. BMC Public Health. 2012; 12 - 1005.
9. *Glade M.J.* Caffeine not - just a stimulant. Nutrition. 2010; 26(10), 932-938.
10. *González-Moreno, M.J.* Estimación de la ingesta de nutrientes mediante los estudios de dieta total. En Endocrinología y Nutrición. 2006; 53(5), 300-308.
11. *Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M.* Effects of caffeine on human health. Food Additives & Contaminants. 2003. 20(1), 1-30.
12. *Olmos V, Bardoni N, Ridolfi A S, Villaamil Lepori E C.* Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. Food Additives and Contaminants. 2009; 26(3), 275-281.
13. *Pardo Lozano R, Álvarez García Y, Barr al Tafall D, Farré Albaladejo M.* Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. Barcelona, ADICCIONES. 2007. 19(3), 225-238.
14. *Smith, A.* Effects of caffeine on human behavior. Food and chemical toxicology. 2002; 40(9), 1243-1255.
15. *Temple J L, Dewey A M, Briatico L N.* Effects of acute caffeine administration on adolescents. Exp Clin Psychopharmacol. 2010; 18(6), 510-20.
16. *Temple, J L.* Caffeine use in children: what we know, what we have left to learn, and why we should worry. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2009; 33(6), 793-806.

Toxicidad asociada a vapores de mercurio en una lactante: a propósito de un caso

Escobar Toledo I.E.[1], Berrouet Mejía M.C.[2], Quevedo Vélez A.[3]

[1] *Médica y Cirujana, Especialista en Toxicología Clínica, Hospital Universitario de San Vicente Fundación, Medellín, Colombia.*
[2] *Médica y Cirujana, Especialista en Toxicología Clínica, Hospital General de Medellín, Clínica SOMA, Medellín. Docente Farmacología y Toxicología Pregrado y Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia.*
[3] *Médico y cirujano, Especialista en Pediatría y Cuidado Intensivo Pediátrico. Msc. Ciencias Clínicas. Docente Pregrado y Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Pediatra Intensivista, Unidad de Cuidado Intensivo Pediátrico, Hospital Universidatio de San Vicente Fundación, Medellín, Colombia.*

Resumen: La exposición a metales pesados como el mercurio genera toxicidad para los seres humanos, ocasionando riesgos neurológicos, respiratorios, hematológicos y renales, los cuales están directamente relacionados con el estado químico del metal, que está a su vez influenciado por la ruta de entrada al organismo, el tiempo de exposición, biotransformación y eliminación. Hay pocos informes de casos de toxicidad relacionada con vapores de mercurio, en los cuales hay compromiso neurológico y pulmonar. Presentamos el caso de una lactante expuesta de forma aguda a vapores de mercurio, quien presentó compromiso pulmonar como principal manifestación de toxicidad y respondió adecuadamente al tratamiento con Ácido Dimercapto Succínico (DMSA).

Palabras claves: Intoxicación por mercurio, quelante, DMSA, Succimer

Abstract: ***Mercury steam toxicity in a nursling: case report***

The exposition to heavy metals like mercury generates toxicity to humans, producing neurologic, pulmonary, hematologic and renal risks, which are directly related to the chemical state of the metal, also influenced by the route of access to the organism, time of exposition, biotransformation and elimination.There are few reports of toxicity related to mercury steam, with neurologic and pulmonary injury. Here we present the case of a nursling girl with acute exposition to mercury vapors, who presented with pulmonary injury as the main manifestation of toxicity, with a good recovery after Dimercapto Succinic Acid (DMSA) treatment.

Keywords: Mercury poisoning, chelator, DMSA, Succimer

Introducción

Para el año 2013, el Instituto Nacional de Salud reportó que el 65% de los casos de intoxicación ocupacional por sustancias químicas estaba asociado con metales pesados, de los cuales es importante resaltar el mercurio, entendiendo la alta frecuencia de minería artesanal. Hasta un 44% de los municipios de Colombia desarrollan minería tradicional de hecho, representan el 30% del total de explotaciones mineras (Defensoría del Pueblo, 2010).

Los riesgos derivados de la exposición a metales son explicados porque, posterior a su ingreso al organismo se unen a múltiples proteínas esenciales, llevando a disfunción y muerte celular (Berrouet et al, 2008).

La exposición a metales pesados como el mercurio genera toxicidad para los seres humanos, ocasionando riesgos neurológicos, respiratorios, hematológicos y renales, dependiendo de la forma a la que sea expuesto. La toxicidad y los riesgos asociados a este metal se encuentran directamente relacionados con el estado químico del mismo, que son influenciados a su vez por la ruta de entrada del metal al organismo, el tiempo de exposición, biotransformación y eliminación (Berrouet et al, 2008; Magos y Clarkson, 2006).

Dada la frecuencia de la intoxicación por este metal en nuestro país, considerando que en los protocolos de manejo del paciente intoxicado de la Dirección Seccional de Salud de Antioquia (DSSA), el quelante propuesto para el tratamiento es Penicilamina y que en el país hay una carencia de antídotos de mayor eficacia en este escenario, este tipo de intoxicación debe ser considerado como un problema de salud pública, con alto riesgo de compromiso multisistémico y secuelas permanentes (Magos y Clarkson, 2006).

Hay pocos informes de casos de toxicidad relacionada con vapores de mercurio, en los cuales hay compromiso neurológico y pulmonar; nuestro objetivo es reportar el uso exitoso de Succimer, un antídoto que no está frecuentemente disponible en nuestro medio, en una paciente lactante.

Materiales y métodos

Se realizó seguimiento estricto del caso desde el ingreso, documentando la evolución clínica y de paraclínicos.

Se llevaron a cabo búsquedas bibliográficas de bases de datos, PubMed, Scielo, Medline, Ovid y Science Direct.

Se utilizaron las palabras clave intoxicación por mercurio, vapores de mercurio, toxicidad pulmonar, quelante, DMSA, Succimer.

Presentación del caso

Paciente de cuatro meses de edad, sin antecedentes patológicos y con esquema de vacunación completo para la edad.

La noche previa a la consulta, según relata el padre de la paciente, se realizó dentro del hogar manipulación de "una bola de oro con fuego", se presentó liberación de vapores en moderada cantidad, por lo cual suspendieron dicha actividad y encendieron el extractor de la cocina. La paciente se encontraba en otra habitación, a varios metros del lugar del incidente. Durante esa noche la paciente no presentó síntomas, la madre de la paciente refirió dificultad respiratoria transitoria que mejoró rápidamente. Aproximadamente 12 horas después de la exposición la paciente comienza a presentar cuadro de irritabilidad, disnea progresiva y tos; niegan fiebre u otros síntomas. Al ingreso a urgencias pediátricas se encontraba somnolienta, con síndrome de dificultad respiratoria, estridor, aleteo nasal, retracciones subcostales, sin hallazgos auscultatorios. Leve mejoría del estado neurológico después de administración de Oxígeno por cámara cefálica 98%, pero aún polipneica y con aleteo nasal, saturación 100%; radiografía de tórax con infiltrados intersticiales difusos y neumomediastino (Imagen 1).

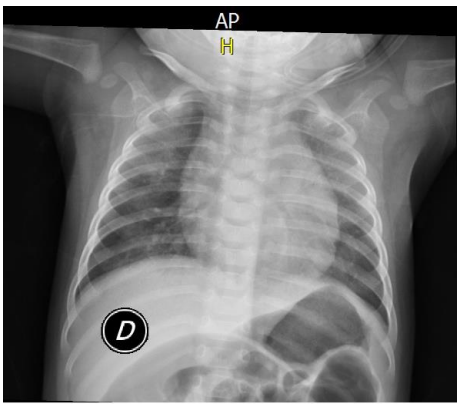

Imagen 1: Radiografía de tórax al ingreso.

*e-mail: isaescobartoledo@gmail.com

Ante los hallazgos clínicos y de laboratorio se sospechó cuadro de neumonitis química asociada a inhalación de vapores de mercurio, dado el inicio súbito de los síntomas y dificultad respiratoria de rápida progresión; además madre de la paciente con síntomas respiratorios, aunque de menor intensidad.

Se trasladó a la Unidad de Cuidado Intensivo Pediátrico por el alto riesgo de falla ventilatoria; al ingreso a UCI con regular aspecto general, reactiva e irritable al tacto. FC: 172 x min, PA: 99/58 mmHg, FR: 80 x minuto, Saturación de oxígeno 100% con FiO2 al 90%. T: 36.8°C. Peso: 6.1 Kg. En las primeras 12 horas sólo requirió soporte con O2 al 100% e hidratación parenteral.

12 horas después del ingreso presentó mayor compromiso sistémico y presento síndrome de dificultad respiratoria.PA: 110/59 FC: 184 FR: 60 x min palidez mucocutánea, aleteo nasal, quejido constante. Tiraje subcostal y retracciones universales, taquipneica. Ruidos cardíacos rítmicos, taquicárdicos, pulmones con disminución del murmullo vesicular en bases, especialmente la izquierda, crépitos finos escasos. Poco reactiva al medio, no establece contacto visual, poco parpadeo, llanto débil. Por falla ventilatoria, requirió intubación orotraqueal y soporte ventilatorio bajo sedación y analgesia. Se realizó radiografía de tórax de control que evidenció imagen de neumomediastino disecando hasta pericardio; compromiso intersticial central y tendencia a consolidar en las bases, sin neumotórax ni hidrotórax. Enfisema subcutáneo cervical bilateral (Imagen 2).

Imagen 2: Radiografía de tórax, se observa neumomediastino.

Se solicitó niveles de mercurio en sangre reportándose 139 mcg/L. Se inició manejo con Succimer 10mg/kg (60mg) cada 8 horas por sonda nasogástrica, para cinco días de tratamiento con esta dosis. El medicamento se inició 48 horas después de la exposición y 36 horas después del inicio de los síntomas.

Presentó inestabilidad hemodinámica con signos de hipoperfusión generalizada, taquicardia y oliguria; iniciándose soporte vasopresor con adrenalina en infusión hasta 0,3 mcg/kg/hora y líquidos endovenosos, luego de desmontar vasopresores Se logró también extubación posterior a cuatro días de soporte ventilatorio, con adecuada tolerancia y reducción progresiva del aporte de O2 suplementario.

Se completó tratamiento con Succimer por cinco días y se inició tratamiento de continuación, 10mg/kg cada 12 horas durante 14 días, con adecuada tolerancia y sin presentar reacciones adversas.

La paciente fue dada de alta, con buen estado neurológico y respiratorio, sin evidencia clínica ni paraclínica de compromiso sistémico.

Una semana después de terminar el primer ciclo de tratamiento quelante, se realizó control ambulatorio de niveles de mercurio en sangre, los cuales persistían elevados: 41,25 mcg/L. Considerando la edad y el alto riesgo de toxicidad y secuelas relacionadas, se decidió reiniciar nuevo ciclo de tratamiento con Succimer oral: 10mg/kg (80mg) cada 8 horas durante cinco días y posteriormente igual dosis cada 12 horas durante 14 días. Toleró adecuadamente el tratamiento, sin reacciones adversas y, una semana después de terminado el ciclo de quelación, se realizaron niveles de control, los cuales se encontraban por debajo del valor normal para personas expuestas (15 mcg/L).

Se ha realizado seguimiento ambulatorio de la paciente, hasta el momento no hay evidencia de compromiso neurológico o de otros órganos o sistemas.

Resultados

Las tablas 1, 2 y 3 evidencian la evolución de los paraclínicos realizados a la paciente, desde el momento del ingreso, durante el tratamiento quelante y hasta el seguimiento ambulatorio.

Tabla 1. *Paraclínicos de ingreso y primeros cinco días de tratamiento.*

	10/04/2017	11/04/2017	12/04/2017	13/04/2017	14/04/2017	15/04/2017	17/04/2017
Leucocitos	21500		17900	13800	7000		
Neutrófilos	17400		10800	5500	3900		
Hb	10,4		7,9	12,1	11,9		
Hcto	31,1		23,5	35,9	35,4		
Plaquetas	657000		493000	447000	403000		
pH	7,20		7,29	7,41			
PCO2/HCO3	41/18		44,6/21,3	43,8/26,5			
PaFi	98		253				
Creat/BUN	0,41/4		0,38/2			0,34/7	
AST/ALT	74/29		21/11				
Hg sangre mcg/L		139					
Hg orina mcg/g creat							218

Tabla 2. *Paraclínicos de seguimiento.*

	18/04/2017	19/04/2017	23/04/2017	25/04/2017	28/04/2017
Leucocitos	16200	14100	8400		7500
Neutrófilos	4300	3900	2000		1867
Hb	12,9	12,5	11,3		11,2
Hcto	37,6	37,1	32,9		33,1
Plaquetas	525000		865000		585000
pH		7,42			
PCO2/HCO3		40,3/25,6			
PaFi		360			
Creat/BUN	0,37/9				
Hg sangre mcg/L				40,26	

Tabla 3. *Paraclínicos durante segundo ciclo de tratamiento.*

	08/05/2017	11/05/2017	12/05/2017	13/05/2017	31/05/2017	08/06/2017	13/06/2017
Leucocitos					8900	8600	
Neutrófilos					1600	2600	
Hb					11	11,4	
Hcto					32,3	35,6	
Plaquetas					513000	502000	
Creat/BUN							
Hg sangre mcg/L	41,25						12,16

Discusión

El mercurio es un metal que se encuentra en diferentes estados, según los cuales puede ingresar por diferentes vías al cuerpo humano. Los estados son: mercurio inorgánico, también conocido como metálico; sales de mercurio, en donde se encuentra como Hg++; y el mercurio orgánico. El mercurio metálico, el cual es el objetivo de esta revisión, es volátil a temperatura ambiente, por lo que su principal vía de absorción es respiratoria, mostrando un riesgo para este sistema (Berrouet et al, 2008).

En este caso es importante establecer el nexo epidemiológico con la actividad minera, en la cual se utiliza mercurio metálico en la extracción de oro, y es el grupo de mayor riesgo de inhalación de vapores tóxicos, que coincide con reportes como el de Cicek-Senturk donde se encuentra el riesgo neurológico, renal y respiratorio, como se evidenció en este caso (Cicek-Senturk et al, 2014; Fiesenbichler et al, 2011; Sarikaya et al, 2010).

El mercurio se absorbe principalmente en forma de vapores, por ser volátil a temperatura ambiente. Así como en el caso reportado, los principales riesgos de la inhalación son neurológicos y respiratorios, llegando incluso a producir cuadros de síndrome de dificultad respiratoria (Suzuki et al, 1977; Bernhoft RA, 2012; Clarkson et al, 2003).

En el organismo el mercurio interactúa con una gran variedad de moléculas como grupos fosforilo, carboxilo y amida, interfiriendo en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, homeostasis del calcio, fosforilación proteica y con disfunción de mecanismos de transporte y procesos de estrés oxidativo (Berrouet et al, 2008; Tostado E, 2014).

En el caso reportado por Gao y colaboradores (Gao et al, 2017), en el que una paciente en edad preescolar expuesta a vapores de mercurio desarrolló complicaciones respiratorias, como en el caso aquí reportado, es importante resaltar también el riesgo neurológico evidenciado también en dicho reporte; en cuanto a este riesgo Henriksson (Henriksson y Tjälve, 1998) y Bose-O'Reilly (Bose-O´Reilly et al, 2010), desde la década de los noventa, plantearon la migración de estos vapores hasta el sistema nervioso central a través de la vía olfatoria. En el sistema nervioso central, el ion mercurio ingresa a la neurona como si hiciera parte del intercambio aniónico de la misma, afectando la concentración intracelular de los aniones que se usan para la liberación de neurotransmisores, deteriorando las funciones básicas neuronales (Moreno J, 2013). Una vez en la célula, se altera el metabolismo celular por los mecanismos anteriormente mencionados (Gao et al, 2017; Henriksson y Tjälve, 1998; Bose-O´Reilly et al, 2010).

Algunos autores han planteado diferentes fases en la intoxicación por vapores de mercurio, luego de analizar algunos casos reportados. La primera fase se manifiesta como un síndrome gripal o flu-like; la fase intermedia se caracteriza por mayor evidencia de síntomas pulmonares; la fase final se caracteriza por un síndrome de dificultad respiratoria adicional al compromiso neurológico. En los niños está descrita la acrodinia como una manifestación de hipersensibilidad y de toxicidad crónica del mercurio elemental (Gao et al, 2017).

En el que presentamos el compromiso renal no fue una complicación en la evolución de la intoxicación, a diferencia de lo que se evidencia en otros reportes. En el artículo de Triunfante (Triunfante et al, 2009) uno de los mayores riesgos fue renal y requirieron hemodiálisis en el tratamiento de la intoxicación. Por otro lado, Alby-Laurent y colaboradores (Alby-Laurent et al, 2016) también han reportado el riesgo renal como complicación de la exposición al metal por vía inhalatoria (Barbier et al, 2005; Triunfante et al, 2009; Alby-Laurent et al, 2016).

El tratamiento para la intoxicación con mercurio se desarrolló hace más de 70 años; a través de experimentos animales, se encontró que los tres agentes quelantes, BAL (Dimercaprol), DMPS (Unithiol) y DMSA (Succimer) reducían la mortalidad y disminuían el riesgo de complicaciones renales. Los agentes quelantes contienen grupos sulfihidrilo que permiten neutralizar el mercurio y otros metales pesados (Kosnett M, 2013). La eficacia del tratamiento quelante es dependiente del tiempo, lo cual se logra evidenciar en reportes como el de Alby-Laurent, Chao y el nuestro, en los cuales el inicio temprano de la terapia quelante fue fundamental en la mejoría de los pacientes (Gao et al, 2017; Triunfante et al, 2009; Alby-Laurent et al, 2016; Kosnett M, 2013)

Con respecto a los quelantes, los de mayor eficacia son DMPS y DMSA, que fue el utilizado en el caso reportado. Existen otros quelantes como BAL (British Anti Lewisita), EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) y Penicilamina. Éste último, a pesar de su poca eficacia, es frecuentemente utilizado en países como Colombia; se excreta por la orina y puede producir efectos adversos renales, llegando a requerir diálisis en los casos más complicados (Kosnett M, 2013; Baum C, 1999; OPS, Ministerio de Protección Social de Colombia, 2017)

El ácido 2,3-Dimercapto-1-Propanosulfónico (DMPS) y el ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) se pueden utilizar para el tratamiento quelante en intoxicaciones por mercurio orgánico, elemental e inorgánico, con el fin de evitar la distribución hacia sistema nervioso central (Kosnett M, 2013; Baum C, 1999; OPS, Ministerio de Protección Social de Colombia, 2017). En Suramérica existen reportes de caso de la utilidad del DMPS, pero en ninguno de ellos se ha evidenciado una eficacia mayor que la del DMSA (Valderas et al, 2013).

El tratamiento brindado a nuestra paciente contrasta con la evidencia planteada en otros reportes, que plantean al DMSA como un quelante ineficaz; en nuestro reporte, al igual que en el de Gao, el DMSA fue fundamental para la mejoría de las manifestaciones clínicas de la intoxicación (Alby-Laurent et al, 2016; Kosnett M, 2013; Nierenberg et al, 1998).

Aunque en este caso se evidencia cómo el compromiso neurológico mejora después del control de las manifestaciones respiratorias, es claro el riesgo de toxicidad del sistema nervioso central en esta forma de intoxicación por mercurio. Para manifestaciones como las convulsiones y las alteraciones en el estado de alerta, el manejo debe ser sintomático con benzodiacepinas, además del tratamiento quelante; sólo algunos autores proponen otras medidas como el uso de Piridoxina para evitar las convulsiones asociadas a la terapia quelante, sin embargo la revisión de diferentes reportes y de bases de datos muestran que las reacciones adversas neurológicas con éstos son menores al10% de los casos (Kosnett M, 2013; Baum C, 1999; Contreras C et al, 2013).

Para finalizar los autores concluimos que, aunque son pocos los reportes de este tipo de intoxicación en el mundo, en países donde la

minería con mercurio es una fuente de ingresos, como lo es Colombia, es importante mejorar la educación sobre los riesgos asociados a la exposición a mercurio metálico y sus vapores, ya que la detección temprana y el tratamiento oportuno evitará consecuencias y secuelas a largo plazo.

Bibliografía

1. *Alby-Laurent F, Honoré-Goldman N, Cavau A, Bellon N, Allali S, Abadie V.* Accidental mercury poisoning in a 12-year-old girl. Arch Pediatr. 2016 Nov;23(11):1161-1164
2. *Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P.* Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. Nephron Physiol. 2005;99:105-110.
3. *Baum CR.* Treatment of mercury intoxication. Curr Opin Pediatr. 1999; 11: 265-8
4. *Bernhoft RA.* Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. Journal of Environmental and Public Health, 2012: 1-10.
5. *Berrouet MC; Escobar IE; González DM* (2008). Toxicidad sistémica asociada con la inyección intramuscular de mercurio metálico: reporte de un caso. Iatreia, 420-425.
6. *Bose-O'Reilly S, Mccarty KM, Steckling N, et al.* Mercury exposure and children's health. J Curr Prob Pediatr Adolesc Health Care. 2010; 40(8): 186–215.
7. *Cicek-Senturk G, Altay FA, Ulu-Kilic A, Gurbuz Y, Tutuncu E, Sencan I.* Acute mercury poisoning presenting as fever of unknown origin in an adult woman: a case report. J Med Case Reports 2014; 8(1): 266.
8. *Clarkson TW, Magos L, Myers G.* The toxicology of mercury: Current exposures and clinical manifestations. N Engl J Med 2003; 349: 1731-1737.
9. *Contreras C, Vásquez N, Díaz L.* Intoxicación accidental con mercurio elemental. Acta méd. peruana [Internet]. 2013 Ene [citado 2018 Jun 05]
10. Defensoría de Pueblo. La Minería de Hecho en Colombia. Defensoría Delegada para los Derechos Colectivos y del Ambiente. Diciembre de 2010
11. *Fiesenbichler J, Werner ME, Sadoghi P, Wolf E, Leithner A.* Auto-aggressive metallic mercury injection around the knee joint: a case report. BMC Surg. 2011; 11: 31.
12. *Gao Z, Ying X, Yan J, Wang J, Cai S, Yan C.* Acute mercury vapor poisoning in a 3-month-old infant: A case report. Clin Chim Acta. 2017; 465: 119-122.
13. *Henriksson J, Tjälve H.* Uptake of inorganic mercury in the olfactory bulbs via olfactory pathways in rats. J Environ Res. 1998; 77(2): 130–140.
14. *Kosnett MJ.* The Role of Chelation in the Treatment of Arsenic and Mercury Poisoning. J Med Toxicol. 2013;9(4):347-54.
15. *Magos L, Clarkson TW.* Overview of the clinical toxicity of mercury. Ann Clin Biochem 2006; 43: 257-268.
16. *Moreno JA.* Alteraciones comportamentales y de personalidad debido a la exposición ocupacional a mercurio en un grupo de mineros del oro de la región del Bagre Antioquia. 2013 [Citado agosto de 2016]. Disponible en: http://bdigital.ces.edu.co:8080/repositorio/handle/10946/899
17. *Nierenberg DW, Nordgren RE, Chang MB, Siegler RW, Blayney MB, Hochberg F, et al.* Delayed Cerebellar Disease and Death after Accidental Exposure to Dimethylmercury. N Engl J Med. 1998; 338(23):1672-6.
18. Organización Panamericana de la Salud. Ministerio de Protección Social de Colombia. Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas 2017. ISBN 978-958 -5401-334
19. *Sarikaya S, Karcioglu O, Ay D, Cetin A, Aktas C, Serinken M.* Acute mercury poisoning: a case report. BMC Emerg Med. 2010; 10: 7.
20. *Suzuki T, Takemoto T, Shishido S, Kani K.* Mercury in human amniotic fluid. Scand J Work Environ Health. 1977; 3(1): 32-5.
21. *Tostado E.* Neurotoxicidad de los metales pesados: Plomo, Mercurio y Aluminio. Una revisión sistemática. 2014. [Citado agosto 2017]. Disponible en: https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/7188/1/TFM-M149.pdf
22. *Triunfante, Soares ME, Santos A, Tavares S, Carmo H, Bastos de L.* Mercury fatal intoxication: two case reports. Forensic Sci Int. 2009 Jan 30;184(1-3):e1-6
23. *Valderas J, Mejías ME, Riquelme J, Aedo K, Aros S, Barrera F.* Intoxicación familiar por mercurio elemental: Caso clínico. Rev. chil. pediatr. [Internet]. 2013 Feb [citado 2018 Jun 05]

Relación entre sobredosis y suicidio en las muertes asociadas al consumo de drogas

Fernández-Quintana A.[1], Miguel-Arias D.[2], Pereiro-Gómez C.[3]

[1]*Servicio de Psiquiatría. Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña*
[2]*Servicio de Psiquiatría. Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña*
[3]*Unidad Asistencial de Drogodependencias. Servicio de Psiquiatría. Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña*

Resumen: Establecer de manera precisa la etiología de las sobredosis continúa siendo una asignatura pendiente cuyas consecuencias implican una grave repercusión para la salud pública. Tanto el suicidio como las sobredosis constituyen dos de las principales causas de muerte prematura en la población joven, mientras que las sobredosis - en su mayoría de causa indeterminada- continúan suponiendo la principal causa de muerte entre los heroinómanos. En el presente artículo se realiza una revisión de la literatura disponible a fin de analizar la relación entre sobredosis y suicidio en las muertes asociadas al consumo de drogas. La heterogeneidad de los estudios, el carácter mayoritariamente retrospectivo de los mismos y la escasez de publicaciones sobre adictos a sustancias distintas de los opiáceos constituyen las principales limitaciones del conocimiento actual. No obstante, se ha establecido una relación bidireccional entre el consumo de tóxicos y la ideación suicida; la drogodependencia aumenta significativamente el riesgo de padecer trastornos depresivos que pueden culminar con el suicidio y, por su parte, la ideación suicida incrementa el riesgo de consumos tóxicos pudiendo desembocar en sobredosis letales. La mayoría de los autores consideran que el suicidio representa una causa infra-diagnosticada de sobredosis. Como factores de riesgo de sobredosis de intencionalidad suicida destacan el mal funcionamiento psicosocial, el consumo continuado durante años, el abuso de heroína, el uso de la vía parenteral, el policonsumo, los síntomas depresivos, los antecedentes personales de sobredosis e intentos de suicidio, la intensa demanda de recursos asistenciales y el escaso conocimiento sobre prevención de sobredosis.

Palabras claves: sobredosis de drogas, muertes inducidas por drogas, mortalidad, ideación suicida, epidemiología.

Abstract: ***Relationship between overdosing and suicidal intent among deaths due to acute adverse drug reactions***

Accurately establishing the etiology of overdose continues to be a pending issue whose consequences imply outstanding clinical relevance and a severe repercussion for public health. Both suicide and overdose are two of the leading causes of premature death among young population, while overdoses - mostly of indeterminate cause - remain to be the leading cause of death among heroin addicts. The aim of this research is to analyze the relationship between overdose and suicide among deaths due to adverse drug reactions through an up-to-date review on the available literature. The heterogeneity of the studies, their frequently retrospective nature and the scarcity of data from samples where addicts misuse substances other than opiates are the main limitations of current knowledge. Nonetheless, a clear bi-directional relationship between drug use and suicidal intent has been established since substance abuse significantly increases the risk of developing depressive disorders which can lead to suicide whilst suicidal intent increases the prevalence of drug consumption and lethal overdoses. Most authors consider suicide as an underrecognized cause of overdose. Some risk factors have been outlined for overdose mortality related to suicidal intent; poor psycho-social functionality, presence of depressive symptoms, personal history of suicide attempts and drug overdoses, long history of drug abuse, heroin abuse, parenteral drug use and poly-consumption as well as a high demand for medical resources and insufficient knowledge on overdose prevention. These findings are relevant in establishing more effective overdose prevention programs and providing adequate assistance to addicts.

Keywords: street drugs, suicide, drug overdose, mortality, suicidal ideation

*e-mail: agueda.fernandez.quintana@gmail.com

Material y métodos

Con el fin de localizar información científica sobre el tema de este artículo se realizó una búsqueda bibliográfica en las principales bases de datos de ámbito sanitario. Dicha búsqueda se realizó en junio de 2017. Las bases de datos consultadas fueron las siguientes:

Pubmed("Street Drugs"[Mesh] OR "Alcohol Drinking" "[Mesh]) AND "Death"[Mesh])

Filters activated: Published in the last ten years, humans, English, Portuguese, Spanish

Resultados: 83

Embase: (street drug/ OR alcohol consumption/) AND Death/) published in the last 10 years, Humans, English, Portuguese, Spanish Resultados: 221

Resultados:

Importancia de la interrelación entre sobredosis y suicidio:

Se ha descrito la existencia de un modelo bidireccional entre la ideación suicida y el consumo de drogas. Por una parte, el consumo de sustancias incrementa progresivamente el riesgo de aparición de ideas suicidas (Choi et al, 2016), mientras que la ideación suicida aumenta las tasas de abuso y dependencia de sustancias (Zhang y Wu, 2014). Por lo tanto, se postula que las sobredosis y los intentos de suicidio se sitúan en un mismo espectro de alteraciones conductuales interrelacionadas de modo complejo (Garnefsky y de Wilde, 1998).

El suicidio y las sobredosis tóxicas representan dos de las principales causas de muerte prematura entre la población joven (Roy et al, 2004). Así mismo, algunos estudios encuentran que las sobredosis constituyen el principal método suicida en los jóvenes (Bready et al, 2017).

Teniendo en cuenta la elevada frecuencia de episodios de sobredosis entre los drogodependientes, nos encontramos ante un dato verdaderamente alarmante. El 12% de los usuarios jóvenes de drogas por vía parenteral presentan al menos un episodio de sobredosis durante un intervalo de seguimiento de 3 meses (Evans et al, 2012) y el 11% de los jóvenes con abuso de sustancias por cualquier vía de administración presenta como mínimo un episodio de sobredosis a lo largo de seis meses (Werb et al, 2008). Además, el riesgo de sobredosis aumenta cuanto más prologado es el periodo de consumo. Estudios con un mayor tiempo de seguimiento identifican tasas de hasta un 15,9% de sobredosis entre los jóvenes consumidores de drogas a lo largo de 7 años, estimando una densidad de incidencia de sobredosis de 7,67 casos por 100 personas-año (Mitra et al, 2015).

Estos datos no se aplican únicamente a poblaciones jóvenes, sino que parecen englobar a todo el colectivo de drogodependientes. En este contexto, se ha identificado que el 11,5% de los pacientes con diagnóstico de dependencia a heroína – independienteme nte de su edad presenta al menos un episodio de sobredosis en los 90 días

previos a iniciar tratamiento de mantenimiento con metadona y el 2,4% de este colectivo desarrolla al menos dos episodios de sobredosis en este mismo intervalo (Neale et al, 2005).

Tanto la incidencia como la prevalencia de sobredosis parecen haber aumentado a nivel mundial en la última década, produciendo un incremento en la mortalidad y los costes asociados a este fenómeno (Giraudon et al, 2012). En un reciente metaanálisis en el que se incluyeron 169 estudios sobre mortalidad asociada a sobredosis publicados entre los años 1980 y 2013 se concluye que la tasa de sobredosis en poblaciones drogodependientes oscila entre el 16,6% y el 68% (tasa media: 45,4%, mediana 47%, desviación estándar 14,4%) (Martins et al, 2015). Por otra parte, en un amplio estudio multicéntrico (N = 2.261) realizado en una muestra de pacientes que acuden al Servicio de Urgencias por sobreingesta medicamentosa y/o sobredosis de drogas ilícitas, se identificó un 9% de intentos de suicidio confirmados (Vallersnes et al, 2015) y en algunas cohortes, la causa más frecuente de muerte en estos episodios son las sobredosis de opiáceos (Lund et al, 2012).

En definitiva, teniendo en cuenta estas cifras cabe reflexionar sobre el grave problema de salud pública que representan las sobredosis y el amplio espectro de repercusión de las mismas. Comprender de modo más preciso la compleja interrelación entre suicidio y sobredosis se convierte, por lo tanto, en una necesidad urgente.

Conocimiento actual y controversias en la diferenciación etiopatogénica de sobredosis y suicidio:

Aunque existen amplios estudios sobre las características clínicas, toxicológicas y socio-biográficas de aquellos pacientes que presentan episodios de sobredosis, la investigación sobre las características asociadas al suicidio en drogodependientes es más heterogénea y controvertida.

En primer lugar, como factores de riesgo asociados con una elevada probabilidad de sobredosis se han identificado las siguientes características (Mitra et al, 2015; O'Halloran et al, 2017).:

- Patrón compulsivo de consumo ("*binge drug use*").
- Consumo de cristal de metanfetamina.
- Abuso y/o dependencia de opiáceos (tanto por vía parenteral como por cualquier otra vía de administración).
- Consumo de heroína.
- Policonsumo de drogas por vía parenteral.
- Abandono reciente del tratamiento de desintoxicación.
- Compartir jeringuillas o agujas.
- Uso de drogas relacionado con la actividad sexual.
- Periodo de abstinencia reciente propiciado por encarcelación (Schwartz et al, 2013; Sherman et al, 2013)

En segundo lugar, se han establecido algunos factores de riesgo comunes en cuanto a sobredosis y mortalidad suicida; la falta de hogar, el consumo de drogas por vía parenteral y el policonsumo (Richer et al, 2013). Así mismo, se ha identificado un mayor riesgo de letalidad suicida en sobredosis asociadas al policonsumo de drogas. En una muestra de 1.603 autopsias médico-legales realizadas en fallecidos por causa no natural (accidente, suicidio u homicidio) con análisis toxicológicos positivos para drogas psicoactivas entre los años 2000 - 2009 en Oslo, se identificaron un 7,11% de suicidios por sobredosis. Estos casos presentan las tasas más elevadas de policonsumo de drogas, con un perfil toxicológico similar a las intoxicaciones accidentales. No obstante, a lo largo de los 10 años de seguimiento, se observó un incremento progresivo en el policonsumo de drogas (metadona, cannabis, anfetaminas y benzodiacepinas) y en los análisis toxicológicos se identificaba metadona con una frecuencia 20 veces superior a buprenorfina (Delaveris et al, 2014).

A pesar de estos apuntes, no se han encontrado hallazgos específicos en los análisis toxicológicos de pacientes con intencionalidad suicida y por lo tanto no se han establecido pautas concretas de diferenciación en relación con los fallecimientos por sobredosis accidental (Okic et al, 2013).

Cabe reseñar que los intentos de suicidio son especialmente frecuentes si la droga de abuso es la heroína y la mayor parte de los estudios que analizan tasas de suicidio en drogodependientes se han llevado a cabo en poblaciones con dependencia a opiáceos. Un dato clave a tener en cuenta es que resulta complejo y en ocasiones poco realista establecer una completa dicotomía en cuanto a la etiología de las sobredosis de heroína.

En estudios retrospectivos realizados en colectivos de heroinómanos, se han cifrado tasas del 50,51% de sobredosis accidentales y 26,29% de intentos de suicidio a lo largo de la vida (Johnsson y Fridell, 1997). Disponemos además de estudios de seguimiento a 5 años en pacientes que realizan tratamiento de desintoxicación de opiáceos. En estos estudios, hasta el 45% de los pacientes admiten haber llevado a cabo un intento de suicidio en algún momento y estas tentativas suicidas son significativamente más frecuentes entre aquellos heroinómanos que han presentado también episodios de sobredosis (Bradvik et al, 2007). Así mismo, se ha identificado que el riesgo de intentos de suicidio se incrementa de manera directa al aumentar el número de episodios de sobredosis (Stoove et al, 2009).

Al igual que ocurre con las sobreingestas medicamentosas, existe una gran controversia en torno a la precisión nosológica de las clasificaciones actuales aplicadas para determinar las causas de muerte tras episodios de sobredosis (Rockett et al, 2015; Rockett et al, 2014; Jougla et al, 2002). Algunos autores señalan que las sobredosis de causa "indeterminada" o "desconocida" podrían ser realmente sobredosis suicidas mal clasificadas. Además, es posible que un porcentaje importante del total de muertes por sobredosis se asocie a pensamientos de muerte sin llegar a alcanzar una ideación suicida franca (Bohnert et al, 2013).

En este contexto, se ha planteado que el suicidio es una causa de muerte infraestimada y erróneamente clasificada entre los fallecimientos por sobredosis a nivel mundial, de lo que se deriva un importante detrimento a la hora de diseñar e implantar programas de prevención del suicidio más eficaces.

Por lo tanto, aunque clásicamente se ha descrito un carácter dicotómico en las sobredosis: accidental o suicida, existe gran dificultad para establecer con exactitud la intencionalidad de esta conducta (Britton et al, 2012). Así mismo, la propia intoxicación tras el consumo de sustancias puede generar en el sujeto un efecto desinhibidor, facilitando el paso al acto y la consecuente ejecución de conductas suicidas (Richer et al, 2013).

Diversos autores apuntan que incluso las sobredosis de apariencia accidental podrían expresar una finalidad autolítica subyacente (Farrell et al, 1996). De este modo, las sobredosis podrían ser una manifestación de ideación suicida ambivalente, en el contexto del marcado deterioro personal y social asociado a la drogodependencia (Heale et al, 2003; Neale, 2000; Vingoe et al, 1999).

En una revisión bibliográfica de publicaciones realizadas entre 1990 y 2010 sobre suicidio y sobredosis en poblaciones de drogodependientes, se concluyó que el abuso de drogas constituye un factor de riesgo tanto para el suicidio consumado como para los intentos de suicidio y las sobredosis (letales y no letales). Además, aquellos usuarios de drogas que presentaban antecedentes de intentos de suicidio y sobredosis, se caracterizaban por un peor funcionamiento psicosocial y una mayor gravedad de sus conductas adictivas, por lo que representaban un grupo de alto riesgo de mortalidad por suicidio consumado (Bohnert et al, 2010). Estos hallazgos se consolidan en un estudio posterior realizado en una muestra de 5.892 adictos que iniciaban tratamiento de deshabituación tóxica en centros especializados de EE.UU (Bohnert et al, 2011).

Al explorar de manera retrospectiva la intencionalidad suicida en los

consumidores de droga que han experimentado sobredosis no letales a lo largo de su vida, se ha encontrado que el 49% refieren haber presentado pensamientos de muerte y/o ideación suicida antes de la sobredosis. Así mismo, estos pacientes señalan como detonantes de la ideación suicida una serie de factores psicosociales desfavorables (eventos estresores precipitantes, conflictiva vivencial y relacional y escasez de estrategias de afrontamiento); todos estos factores son altamente prevalentes entre los drogodependientes (Neale, 2000).

De hecho, otros estudios también enfatizan que las circunstancias vitales adversas y el deterioro psico-social se asocian con sobredosis e intentos de suicidio (Burns et al, 2004). Otro indicador a tener en cuenta a la hora de evaluar la intencionalidad suicida son las elevadas tasas de utilización de recursos sanitarios por parte de la población de drogodepedientes. Algunos autores señalan que esta búsqueda de recursos sanitarios por parte de los consumidores de tóxicos no sólo se asocia a una búsqueda de potenciales sustancias de abuso (prescripción de benzodiacepinas y opiáceos) sino a la búsqueda de ayuda en situaciones de desesperanza. En este contexto, se ha identificado una creciente demanda de asistencia sanitaria *("doctor shopping")* en los años previos al fallecimiento por sobredosis de heroína entre los pacientes con dependencia a opiáceos (Martyres et al, 2004).

De acuerdo con la *"Teoría Interpersonal del suicidio"*, la habituación a experiencias dolorosas aumenta la posibilidad de consumar el suicidio, siendo ésta un paso necesario en la transición entre la ideación suicida y la ejecución de un intento de suicidio. En este sentido, se ha postulado que la tolerancia al dolor que se produce en los usuarios de drogas por vía parenteral podría aumentar el riesgo de tentativas autolíticas. Estas conclusiones han sido extraidas de estudios realizados sobre una muestra de 10.203 adultos con abuso de drogas por vía parenteral y antecedentes de Depresión Mayor (Cheek et al, 2016). Disponemos de un estudio realizado en una muestra de 2.095 adolescentes (12 - 17 años) con consumo de drogas y sintomatología depresiva evaluada a través de la encuesta *National Survey on Drug Use and Health (2004-2011)* que identifica la asociación entre el empleo de la vía parenteral y las tentativas autolíticas (pero no con la presencia de ideación ni planificación suicida). Además, entre aquellos adolescentes con ideas de muerte o ideación autolítica estructurada, la vía parenteral también se asociaba con tentativas autolíticas consumadas (Liu et al, 2014).

Encontramos también autores que señalan que el abuso de sustancias ilícitas y los episodios de sobredosis se derivan de la baja autoestima y desesperanza, prevalentes entre el colectivo de drogodependientes, adoptando una actitud de pasividad y descuido ante su propia vida (Rossow, 1998). Las conductas de riesgo y especialmente las sobredosis serían aún más acentuadas entre los jóvenes sin techo, llegando a protagonizar reiterados episodios de sobredosis dentro de un estilo de vida autodestructivo en el que predominan las conductas de alto riesgo (Kidd, 2004).

Sin embargo, otros autores defienden que la conducta suicida y las sobredosis son fenómenos independientes y bien diferenciados. Se han publicado estudios que intentan establecer un marco de diferenciación entre las sobredosis y los intentos de suicidio en base al perfil psicopatológico de los pacientes (en función del resultado del *Test de Personalidad de Millon*) y al patrón de consumo de tóxicos (Ravndall y Vaglum, 1999*)*.

También encontramos autores que postulan que sólo un 10% de las sobredosis en adictos a la heroína presentan intencionalidad letal y que las características de las sobredosis con intencionalidad suicida son diferentes de aquellas sobredosis de carácter accidental, en base a los antecedentes psiquiátricos y tóxicos de cada paciente. Estos autores intentan establecer un marco diferencial para los intentos de suicidio en comparación con las sobredosis accidentales en pacientes que realizan un programa de mantenimiento con metadona, diseñando patrones conductuales basados en *"rasgos de pertenencia, sobrecarga y soledad"* de cada caso (Conner et al, 2007).

Así mismo, en otro estudio realizado en una muestra de 1.500 pacientes con dependencia a opiáceos, se encontró una mayor prevalencia de sobredosis no letales (58%) que de intentos de suicidio (32%), estableciéndose una serie de características diferenciadoras entre las sobredosis y los intentos de suicidio. Por una parte, las conductas de riesgo asociadas al uso de sustancias (elevada impulsividad, dependencia de hipno-sedantes, administración de drogas por vía parenteral, etc) se asociaban con episodios de sobredosis no letales.

Por otra parte, los antecedentes personales de comorbilidad psiquiátrica (trastornos depresivos, trastorno límite de personalidad, trastornos de ansiedad, etc) se correlacionaban con tasas más elevadas de intentos de suicidio. No obstante, pese a que este estudio diferencia ambos patrones conductuales, también reseña la elevada gravedad clínica de aquellos pacientes que habían presentado tanto sobredosis no letales como intentos de suicidio, apuntando la necesidad de evaluación mediante programas específicos de asesoramiento del riesgo de letalidad suicida (Maloney et al, 2009).

Por último, encontramos estudios que diferencian el patrón de conducta suicida y sobredosis en función del sexo; en una cohorte australiana de adictos a la heroína, el 50% de las mujeres y el 31% de los varones habían presentado al menos un intento de suicidio durante su evolución. Las mujeres presentaban mayores tasas de reincidencia en cuanto a tentativas autolíticas, llevaban a cabo el primer intento de suicidio 6 años antes que los varones y presentaban con mayor frecuencia intentos de suicidio antes de iniciar el consumo de heroína, siendo estos datos estadísticamente significativos. Aunque las sobredosis de heroína eran frecuentes en la totalidad de la muestra (66%), los métodos empleados con mayor frecuencia en las tentativas autolíticas eran las sobredosis de otras sustancias y la venoclisis. Solo el 10% de estos pacientes admitían haber realizado una sobredosis de opiáceos con finalidad suicida (Darke y Ross, 2001).

No conviene olvidar que también existen otras dificultades añadidas que impiden demostrar con exactitud la causalidad entre ideación suicida y sobredosis. Entre ellas, cabe citar que en los estudios retrospectivos la ideación autolítica inicial puede aparecer enmascarada por las propias alteraciones cognitivas posteriores al estado de intoxicación severa (Goldston, 2004).

La mayoría de los estudios disponibles sobre evidencias de suicidio en episodios de sobredosis son transversales o han sido realizados únicamente en muestras de usuarios de opiáceos.

No obstante, también disponemos de algunos estudios longitudinales realizados en muestras de adolescentes que encuentran una relación estadísticamente significativa entre la presencia de sobredosis accidentales e ideación suicida a lo largo de 5 años de seguimiento, de tal modo que la ideación autolítica severa aumenta el riesgo de sobredosis clasificada como *"accidental"* aproximadamente en un 50% (Richer et al, 2013).

Modelos de prevención de letalidad suicida por sobredosis:

Se han identificado crisis de salud pública de gran magnitud relacionadas con elevadas tasas tanto de suicidio como de sobredosis, a modo de fenómenos paralelos cuya prevención requeriría, por tanto, de abordajes terapéuticos comunes (Hacker et al, 2008).

Una correcta evaluación de la salud mental de los drogodependientes constituye un elemento clave a la hora de establecer estrategias preventivas de suicidio y sobredosis en este colectivo. Se ha encontrado asociación entre el abuso de drogas, los Trastornos Depresivos y la ideación suicida. En este sentido, disponemos de estudios que evalúan la psicopatología de los pacientes con abuso de sustancias, encontrando los siguientes resultados: pensamientos de muerte (mujeres 50%, varones 33%), ideación autolítica (mujeres 39%, varones 21%), antecedentes de tentativas autolíticas (mujeres 33%, varones 11%) (Cottler et al, 2005). En otro estudio realizado en

una muestra de 729 usuarios de heroína y cocaína se objetiva que una puntuación elevada en las escalas de depresión *(Centre for Epidemiological Studies Depression Scale, CES-D)* se correlaciona con una alta probabilidad de haber presentado episodios de sobredosis en los últimos 12 meses (Tobin et al, 2003).

Otros autores establecen una correlación entre la tipología del consumo de drogas y la presencia de alteraciones tímicas, de tal modo que las tasas más elevadas de síntomas depresivos se encontraban entre los usuarios de heroína, seguido de los consumidores de metanfetamina, cocaína o crack y finalmente marihuana (Hardland et al, 2011).

También se ha publicado una revisión sistemática y metaanálisis que compara la frecuencia de sobredosis entre pacientes deprimidos y no deprimidos, encontrando una mayor frecuencia de episodios de sobredosis no letales en aquellos consumidores de sustancias con diagnóstico de Trastorno Depresivo (Bartoli et al, 2015).

Por lo tanto, es necesario poner en marcha campañas preventivas de suicidio entre la población de drogodependientes, y dada la íntima relación entre sobredosis y suicidio, una interesante diana terapéutica se centra en la formación de los usuarios de drogas sobre las conductas de riesgo que pueden conllevar la muerte por reacción aguda tras consumo de drogas.

En este sentido, en nuestro país se han llevado a cabo estudios en poblaciones de jóvenes adictos a la heroína (18 – 30 años). Las conclusiones han sido alarmantes, dado que la mayoría de estos pacientes no poseen un conocimiento suficiente sobre los factores de riesgo asociados con sobredosis, especialmente la administración de heroína por vía parenteral tras un periodo de abstinencia o la administración conjunta de heroína con alcohol o metadona (Neira-León et al, 2006).

Por otra parte, los programas de prevención del riesgo de sobredosis instaurados en drogodependientes han proporcionado resultados insatisfactorios hasta la fecha (Bozinoff et al, 2017).

En España, los programas de control de la vía de administración, cantidad y tipo de heroína administradas no han reducido en grado mínimo el riesgo de sobredosis. Tampoco se ha alcanzado esta meta mediante el control del uso concomitante de otras sustancias (Neira-León et al, 2011).

Pese a la existencia de diversos programas profilácticos con eficacia probada en la reducción de la letalidad por sobredosis de opiáceos, estos se centran en el entrenamiento de drogodependientes para la correcta administración de Naloxona durante los episodios de sobredosis, reduciendo la letalidad global (Leece et al, 2016; Wheeler et al, 2015; Clark et al, 2014; Wolfe et al, 2016; Leece et al, 2013) y en la instauración de programas de mantenimiento con metadona o buprenorfina (Sordo et al, 2017; Huang et al, 2013; Brugal et al, 2005; Schwartz et al, 2013; Strang et al, 2010).

Los mejores resultados en cuanto a disminución en la frecuencia de sobredosis se han obtenido con la instalación de salas de administración supervisada de opiáceos por vía parenteral si bien estos dispositivos no se encuentran disponibles en la mayor parte de los países (Irwin et al, 2017; Kerr et al, 2017; Potiers et al, 2014).

Una variable a considerar en el establecimiento de nuevos programas de prevención es la reintegración social de los drogodependientes como vehículo facilitador de la reducción de episodios de sobredosis. Se ha objetivado que la elevada disfuncionalidad relacional que experimentan los drogodependientes se asocia de manera significativa con el riesgo de sobredosis por lo que sería preciso diseñar intervenciones de reinserción social en este colectivo (Latkin et al, 2004).

Por todo lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta que las sobredosis constituyen la primera causa de muerte en los pacientes con abuso de heroína, es preciso instaurar medidas específicas adicionales para reducir el riesgo de letalidad entre los drogodependientes, especialmente entre los consumidores de heroína.

Discusión

En el presente artículo hemos revisado la literatura disponible con el objetivo de analizar la relación entre sobredosis e intencionalidad suicida. Ambos fenómenos siguen siendo altamente prevalentes; tanto el suicidio como las sobredosis constituyen dos de las principales causas de muerte entre los drogodependientes (Roy et al, 2004; Neale et al, 2005). Se ha documentado una amplia variabilidad en las tasas de sobredosis en drogodependientes, estimándose como media que casi el 50% de los drogodependientes presenta episodios de sobredosis a lo largo de su evolución (Martins et al, 2015).

Dada su gravedad, consideramos necesario ampliar el conocimiento actual sobre la etiología de las muertes por sobredosis ya que sólo de este modo podremos instaurar medidas preventivas adecuadas.

Existen importantes limitaciones que afectan a la calidad científica de las investigaciones realizadas sobre diferenciación de sobredosis y suicidios en drogodependientes. Se trata, en su inmensa mayoría, de estudios transversales, retrospectivos y realizados en cohortes de heroinómanos. Estas características merman la fiabilidad de dichos datos dado que en los estudios retrospectivos la ideación autolítica inicial puede aparecer enmascarada por las alteraciones cognitivas posteriores al estado de intoxicación severa (Goldston, 2004). Por otra parte, no se han analizado de manera adecuada las características de los consumidores de otras sustancias y son escasos los estudios longitudinales de seguimiento.

La mayor parte de las muertes por sobredosis son catalogadas como de causa incierta o indeterminada (Bohnert et al, 2013) pero debemos tener en cuenta que la ideación autolítica severa aumenta el riesgo de sobredosis clasificada como *"accidental"* aproximadamente en un 50% (Richer et al, 2013). Muchas sobredosis podrían ser una manifestación de ideación suicida ambivalente o podrían asociarse con pensamientos suicidas latentes, en el contexto del marcado deterioro psico-social asociado a la drogodependencia (Heale et al, 2003; Neale, 2000; Vingoe et al, 1999; Burns et al, 2004).

Existen controversias sobre la posibilidad de diferenciación de suicidios y sobredosis, pero se trata principalmente de estudios aislados, de baja o moderada calidad metodológica y realizados hace más de ocho años. Entre ellos, destacan intentos de diferenciación de conducta suicida y sobredosis basados en el análisis de la personalidad del paciente (Ravndall y Vaglum, 1999), en los patrones conductuales de cada caso (*"rasgos de pertenencia, sobrecarga y soledad")* (Conner et al, 2007), en la comorbilidad psiquiátrica en conjunto con el patrón de consumo (Maloney et al, 2009) y en el sexo del paciente (Darke y Ross, 2001). Cabe destacar que incluso los estudios que ponen en duda la interrelación entre sobredosis y suicidio reseñan la elevada gravedad clínica de aquellos pacientes que protagonizan tanto sobredosis no letales como intentos de suicidio, apuntando la necesidad de evaluación mediante programas específicos de asesoramiento del riesgo de mortalidad suicida

En resumen, nos encontramos ante dos fenómenos paralelos cuya prevención requeriría, por tanto, de abordajes terapéuticos comunes (Hacker et al, 2008).

Pese a las limitaciones metodológicas de los estudios disponibles y a la imposibilidad de establecer con exactitud la etiología de las sobredosis en todos los casos, existen datos consolidados que diferencian las sobredosis de los intentos de suicidio.

Se expone a continuación un resumen de los puntos clave que deben incluirse en la evaluación de los drogodependientes a fin de prevenir fallecimientos por sobredosis de etiología suicida.

Tiempo de consumo:

Cuanto más prolongado es el periodo de consumo de drogas, más se incrementa el riesgo de ideas suicidas (Choi et al, 2016; Mitra et al, 2015) y por su parte, la aparición de ideas suicidas hace aumentar la

prevalencia de abuso de sustancias (provocando un subsiguiente aumento en las tasas de sobredosis letales y no letales) (Zhang y Wu, 2014).

Antecedentes personales de intentos de suicidio y número de episodios de sobredosis:

Un grupo de alto riesgo de mortalidad por suicidio consumado lo constituyen los drogodependientes con antecedentes de tentativas suicidas y episodios de sobredosis (Bohnert et al, 2010). Así mismo, las tentativas suicidas son significativamente más frecuentes entre aquellos heroinómanos que han presentado también episodios de sobredosis (Bradvik et al, 2007) y el riesgo de intentos de suicidio se incrementa de manera directa al aumentar el número de episodios de sobredosis (Stoove et al, 2009).

Patrón de consumo:

El policonsumo de drogas y el empleo de la vía parenteral se asocian con un mayor riesgo de suicidio consumado (Mitra et al, 2015; O'Halloran et al, 2017; Richer et al, 2013; Liu et al, 2014; Park y Song, 2016).

Funcionamiento psico-social:

Un mayor deterioro psico-social y particularmente la falta de hogar se ha asociado con un mayor riesgo de muerte por suicidio (Heale et al, 2003; Neale, 2000; Vingoe et al, 1999; Burns et al, 2004).

Así mismo, entre los jóvenes sin techo que consumen drogas se ha identificado una mortalidad diez veces superior a la población general, encontrándose en estas cohortes elevadas tasas de suicidio y siendo las sobredosis el método suicida empleado con mayor frecuencia (Auerswald et al, 2016).

En adolescentes con abuso de sustancias, el bajo rendimiento académico y bajas puntuaciones en la auto-evaluación de salud también se han identificado como factores de riesgo de sobredosis con intencionalidad suicida (Park y Song, 2016).

La elevada disfuncionalidad relacional que experimentan los drogodependientes se asocia de manera significativa con el riesgo de sobredosis por lo que sería preciso diseñar intervenciones de reinserción social en este colectivo (Latkin et al, 2004).

Demanda de asistencia sanitaria:

Existe una creciente demanda de asistencia sanitaria en los años previos al fallecimiento por sobredosis de heroína entre los pacientes con dependencia a opiáceos (Martyres et al, 2004). Por lo tanto, disponemos de oportunidades terapéuticas para realizar una adecuada valoración psicopatológica de los drogodependientes, centrándonos en la evaluación del riesgo suicida durante este periodo de elevada vulnerabilidad.

Sintomatología depresiva:

Se ha encontrado asociación entre el abuso de sustancias, los Trastornos Depresivos y la ideación suicida (Cottler et al, 2005: Tobin et al, 2003). También se ha descrito una mayor frecuencia de episodios de sobredosis no letales en aquellos consumidores de sustancias con diagnóstico de Trastorno Depresivo (Bartoli et al, 2015). Debemos tener en cuenta que las tasas más elevadas de síntomas depresivos se han documentado entre los usuarios de heroína (Hardland et al, 2011).

Por lo tanto, una correcta evaluación de la salud mental de los drogodependientes constituye un elemento clave a la hora de establecer estrategias preventivas de suicidio y sobredosis, debiendo evaluarse de manera pormenorizada los síntomas afectivos.

Nivel de conocimientos sobre prevención de sobredosis:

La mayoría de estos pacientes no poseen un conocimiento suficiente sobre los factores de riesgo asociados a episodios de sobredosis. Es por tanto necesario ofrecer de manera activa psicoeducación sobre las conductas de alta peligrosidad, entre las que destacan la administración de heroína por vía parenteral tras un periodo de abstinencia y la administración conjunta de heroína con alcohol o metadona (Neira-León et al, 2006).

Una correcta utilización de Naloxona durante los episodios de sobredosis disminuye la letalidad (Leece et al, 2016; Wheeler et al, 2015; Clark et al, 2014; Wolfe et al, 2016; Leece et al, 2013) y debemos seguir promoviendo programas de mantenimiento con metadona o buprenorfina (Sordo et al, 2017; Huang et al, 2013). Estas dos medidas disminuyen significativamente la mortalidad en drogodependientes con riesgo de sobredosis, independientemente de la etiología de la misma.

Conclusiones

- La mayor parte de la evidencia científica documenta una relación bidireccional entre el consumo de drogas y el suicidio.
- Establecer de manera precisa la intencionalidad de las sobreingestas entraña una gran complejidad nosológica.
- Los programas de prevención del suicidio en drogodependientes deben incorporar la evaluación del patrón de consumo (especialmente si existe policonsumo de drogas, abuso continuado de sustancias durante años, consumo de heroína y empleo de la vía parenteral), el funcionamiento psico-social, la sintomatología afectiva, los antecedentes personales de intentos de suicidio y sobredosis, el grado de demanda de asistencia sanitaria y el nivel de conocimiento del paciente sobre estrategias de prevención de sobredosis.
- Es necesario realizar estudios longitudinales y prospectivos, especialmente en colectivos de adictos a drogas no opiáceas a fin de confirmar estos hallazgos.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todo el cuerpo de médicos forenses de Galicia por su sobresaliente labor en la detección, estudio y comunicación de muertes por RAD en nuestra comunidad autónoma, así como al Servicio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela por su esfuerzo en la determinación de las muestras toxicológicas que se reflejan en este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay ningún conflicto de intereses que declarar.

Bibliografía

1. *Auerswald CL, Lin JS, Parriott A.* Six-year mortality in a street-recruited cohort of homeless youth in San Francisco, California. PeerJ. 2016; 14, 4e1909.
2. *Bartoli F, Carrà G, Brambilla G, Carretta D, Crocamo C, Neufeind J, Baldacchino A, Humphris G, Clerici M.* Association between depression and non-fatal overdoses among drug users: a systematic review and meta-analysis. Drug Alcohol Depend. 2014; 1(134), 12-21.
3. *Bohnert AS, McCarthy JF, Ignacio RV, Ilgen MA, Eisenberg A, Blow FC.* Misclassification of suicide deaths: examining the psychiatric history of overdose decedents. Inj Prev. 2013; 19(5), 326-30.
4. *Bohnert AS, Roeder K, Ilgen MA.* Unintentional overdose and suicide among substance users: a review of overlap and risk factors. Drug Alcohol Depend. 2010 ; 110(3), 183-92.
5. *Bohnert AS, Roeder KM, Ilgen MA.* Suicide attempts and overdoses among adults entering addictions treatment: comparing correlates in a U.S. National Study. Drug Alcohol Depend. 2011; 119(1-2), 106-12.

6. *Bozinoff N, Small W, Long C, DeBeck K, Fast D.* Still "at risk": An examination of how street-involved young people understand, experience, and engage with "harm reduction" in Vancouver's inner city. Int J Drug Policy. 2017; 45, 33-39.

7. *Bradvik L, Frank A, Hulenvik P, Medvedeo A, Berglund M.* Heroin addicts reporting previous heroin overdoses also report suicidal attempts. Suicide Life Threat Behav. 2007; 37, 475-81.

8. *Bready JC, Bready RJ, Chute DJ.* A Ten-year Study of Suicides from a Rural/Suburban County. J Forensic Sci. 2017 May 30. doi: 10.1111/1556-4029.13352.

9. *Britton PC, Bohnert AS, Wines JD, Conner KR.* A procedure that differentiates unintentional from intentional overdose in opioid abusers. Addict Behav. 2012; 37(1), 127-30.

10. *Brugal MT, Domingo-Salvany A, Puig R., Barrio G, García de Olalla P, de la Fuente L.* Evaluating the impact of methadone maintenance programmes on mortality due to overdose and aids in a cohort of heroin users in Spain. Addiction. 2005; 100(7), 981-9.

11. *Burns JM, Martyres RF, Clode D, Boldero JM.* Overdose in young people using heroin: associations with mental health, prescription drug use and personal circumstances. Med J Aust. 2004; 181(7 Suppl), S25-8.

12. *Caplehorn JR, Dalton MS, Haldar F, Petrenas AM, Nisbet JG.* Methadone maintenance and addicts' risk of fatal heroin overdose. Substance Use Misuse. 1996; 31(2), 177-96.

13. *Clark AK, Wilder CM, Winstanley EL.* A systematic review of community opioid overdose prevention and naloxone distribution programs. J Addict Med. 2014; 8(3), 153-63.

14. *Clausen T, Anchersen K, Waal H.* Mortality prior to, during and after opioid maintenance treatment (OMT): a national prospective cross-registry study. Drug and Alcohol Dependence. 2008; 94, 151-7.

15. *Conner KR, Britton PC, Sworts LM, Joiner TE Jr.* Suicide attempts among individuals with opiate dependence: the critical role of belonging. Addictive Behaviors. 2007; 32(7), 1395-404.

16. *Cottler L, Campbell W, Krishna VAS, Cunningham-Williams R, Abdallah AB.* Predictors of high rates of suicidal ideation among drug users. J Nerv Ment Dis. 2005; 193(7), 431-437.

17. *Cheek SM, Nestor BA, Liu RT.* Substance use and suicidality: specificity of substance use by injection to suicide attempts in a nationally representative sample of adults with Major Depression. Depress Anxiety. 2016; 33(6), 541-8.

18. *Choi NG, DiNitto DM, Marti CN, Choi BY.* Relationship between marijuana and other illicit drug use and depression/suicidal thoughts among late middle-aged and older adults. Int Psychogeriatr. 2016; 28(4), 577-89.

19. *Darke S, Ross J, Lynskey M, Teesson M.* Attempted suicide among entrants to three treatment modalities for heroin dependence in the Australian Treatment Outcome Study (ATOS): prevalence and risk factors. Drug Alcohol Depend. 2004; 73, 1-10.

20. *Darke S, Ross J.* The relationship between suicide and heroin overdose among methadone maintenance patients in Sydney, Australia. Addiction. 2001; 96(10), 1443-53.

21. *Darke S, Degenhardt L, Mattick R.* Mortality amongst illicit drug users: epidemiology, causes and interventions. 2007. Cambridge: Cambridge University Press.

22. *Degenhardt L.* Mortality among regular or dependent users of heroin and other opioids: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. Addiction. 2011; 106(1), 32-51.

23. *Delaveris GJ, Teige B, Rogde S.* Non-natural manners of death among users of illicit drugs: Substance findings. Forensic Sci Int. 2014; 238, 16-21.

24. *Dietze P, Jolley D, Fry CL, Bammer G, Moore D.* When is a little knowledge dangerous? Circumstances of recent heroin overdose and links to knowledge of overdose risk factors. Drug Alcohol Depend. 2000; 84(3), 223-30.

25. *Evans JL, Tsui JI, Hahn JA.* Mortality among young injection drug users in San Francisco: a 10-year follow-up of the UFO study. Am J Epidemiol. 2012; 4, 302-8.

26. *Farrell M, Neeleman J, Griffiths P, Strang J.* Suicide and overdose among opiate addicts. Addiction. 1996; 91, 321-3.

27. *Garnefski N, de Wilde EJ.* Addiction-risk behaviours and suicide attempts in adolescents. J Adolesc. 1998; 21(2), 135-42.

28. *Giraudon I, Vicente J, Matías J, Mounteney J, Griffiths P.* Reducing drug related mortality in Europe: a seemingly intractable public health issue. Adicciones. 2012; 24(1), 3-8.

29. *Goldston DB.* Conceptual issues in understanding the relationship between suicidal behavior and substance use during adolescence. Drug Alcohol Depend. 2004; 76, S79-91.

30. *Hacker K, Collins J, Gross-Young L, Almeida S, Burke N.* Coping with youth suicide and overdose: one community's efforts to investigate, intervene, and prevent suicide contagion. Crisis. 2008; 29(2), 86-95.

31. *Hadland SE, Marshall BD, Kerr T, Qi J, Montaner JS, Wood E.* Depressive symptoms and patterns of drug use among street youth. J Adolesc Health. 2011; 48(6), 585-90.

32. *Heale P, Dietze P, Fry C.* Intentional overdose among heroin overdose survivors. J. Urban Health. 2003; 80, 230-7.

33. *Huang CL, Lee CW.* Factors associated with mortality among heroin users after seeking treatment with methadone: a population-based cohort study in Taiwan. J Subst Abuse Treat. 2013; 44(3), 295-300.

34. *Irwin A, Jozaghi E, Weir BW, Allen ST, Lindsay A, Sherman SG.* Mitigating the heroin crisis in Baltimore, MD, USA: a cost-benefit analysis of a hypothetical supervised injection facility. Harm Reduct J. 2017; 14(1), 29.

35. *Johnsson E, Fridell M.* Suicide attempts in a cohort of drug abusers: a 5-year follow-up study. Acta Psychiatr Scand. 1997; 96(5), 362-6.

36. *Jougla E, Pequignot F, Chappert J, Rossollin F, Le Toullec A, Pavillon G.* Quality of suicide mortality data. Rev Epidemiol Sante Publique. 2002; 50(1), 49-62.

37. *Kerr T, Mitra S, Kennedy MC, McNeil R.* Supervised injection facilities in Canada: past, present, and future. Harm Reduct J. 2017; 14(1), 28.

38. *Kidd SA.* "The walls were closing in, and we were trapped". A qualitative analysis of street youth suicide. Youth Soc. 2004; 36, 30-55.

39. *Latkin CA, Hua W, Tobin K.* Social network correlates of self-reported non-fatal overdose. Drug Alcohol Depend. 2004; 73(1), 61-7.

40. *Leece P, Gassanov M, Hopkins S, Marshall C, Millson P, Shahin R.* Process evaluation of the Prevent Overdose in Toronto (POINT) program. Can J Public Health. 2016; 107(3): e224-e230.

41. *Leece PN, Hopkins S, Marshall C, Orkin A, Gassanov MA, Shahin RM.* Development and implementation of an opioid overdose prevention and response program in Toronto, Ontario. Can J Public Health. 2013; 104(3), e200-4.

42. *Liu RT, Case BG, Spirito A.* Injection drug use is associated with suicide attempts but not ideation or plans in a sample of adolescents with depressive symptoms. .J Psychiatr Res. 2014; 56, 65-71.

43. *Lund C, Teige B, Drottning P, Stiksrud B, Rui TO, Lyngra M, Ekeberg O, Jacobsen D, Hovda KE.* A one-year observational study of all hospitalized and fatal acute poisonings in Oslo: epidemiology, intention and follow-up. BMC Public Health. 2012; 12, 858.

44. *Madden ME, Shapiro SL.* The methadone epidemic: methadone-related deaths on the rise in Vermont. The American journal of forensic medicine and pathology. 2011; 32(2), 131-5.

45. *Maloney E, Degenhardt L, Darke S, Nelson EC.* Are non-fatal opioid overdoses misclassified suicide attempts? Comparing the associated correlates. Addict Behav. 2009; 34(9), 723-9.

46. *Martins SS, Sampson L, Cerdá M, Galea S.* Worldwide Prevalence and Trends in Unintentional Drug Overdose: A Systematic Review of the Literature. Am J Public Health. 2015; 105(11), e29-49.

47. *Martyres RF, Clode D, Burns JM.* Seeking drugs or seeking help? Escalating "doctor shopping" by young heroin users before fatal overdose. Med J Aust. 2004; 180(5), 211-4.

48. *Mathers BM, Degenhardt L, Bucello C, Lemon J, Wiessing L, Hickman M.* Mortality among people who inject drugs: a systematic review and meta-analysis. Bull World Health Organ. 2013; 91(2), 102-23.

49. *Mitra G, Wood E, Nguyen P, Kerr T, DeBeck K.* Drug use patterns predict risk of non-fatal overdose among street-involved youth in a Canadian setting. Drug Alcohol Depend. 2015; 153, 135-9.

50. *Neale J.* Suicidal intent in non-fatal illicit drug overdose. Addiction. 2000; 95(1), 85-93.

51. *Neale J, Robertson M.* Recent life problems and non-fatal overdose among heroin users entering treatment. Addiction. 2005; 100(2), 168-75.

52. *Neira-León M, Barrio G, Brugal MT, de la Fuente L, Ballesta R, Bravo MJ.* Do young heroin users in Madrid, Barcelona and Seville have sufficient knowledge of the risk factors for unintentional opioid overdose? J Urban Health. 2006; 83(3), 477-96.

53. *Neira-León, M., Barrio, G., Bravo, MJ., Brugal, MT., de la Fuente, L., Domingo-Salvany, A.* Infrequent opioid overdose risk reduction behaviours among young adult heroin users in cities with wide coverage of HIV prevention programmes. The international journal of drug policy. 2011; *22*(1), 16-25.

54. *O'Halloran C, Cullen K, Njoroge J, Jessop L, Smith J, Hope V, Ncube F.* The extent of and factors associated with self-reported overdose and self-reported receipt of naloxone among people who inject drugs (PWID) in England, Wales and Northern Ireland. Int J Drug Policy. 2017; 46, 34-40.

55. *Okic M, Cnossen L, Crifasi JA, Long C, Mitchell EK.* Opioid overdose mortality in Kansas, 2001-2011: toxicologic evaluation of intent. J Anal Toxicol. 2013; 37(9), 629-35.

56. *Park, S., Song, H.* Factors That Affect Adolescent Drug Users' Suicide Attempts. Psychiatry investigation. 2016; 13(3), 360-3.

57. *Potier C, Laprévote V, Dubois-Arber F, Cottencin O, Rolland B.* Supervised injection services: what has been demonstrated? A systematic literature review. Drug Alcohol Depend. 2014; 145, 48-68.

58. *Ravndal E, Vaglum P.* Overdoses and suicide attempts: different relations to psychopathology and substance abuse? A 5-year prospective study of drug abusers. Eur Addict Res. 1999; 5(2), 63-70.

59. *Richer I, Bertrand K, Vandermeerschen J, Roy E.* A prospective cohort study of non-fatal accidental overdose among street youth: The link with suicidal ideation. Drug and Alcohol Review. 2013; 32, 398-404.

60. *Rockett IR, Hobbs GR, Wu D, Jia H, Nolte KB, Smith GS, Putnam SL, Caine ED.* Variable Classification of Drug-Intoxication Suicides across US States: A Partial Artifact of Forensics? PLoS One. 2015; 10(8).

61. *Rockett IR, Kapusta ND, Coben JH.* Beyond suicide: action needed to improve self-injury mortality accounting. JAMA Psychiatry. 2014; 71(3), 231-2.

62. *Rockett IR, Smith GS, Caine ED, Kapusta ND, Hanzlick RL, Larkin GL, Naylor CP, Nolte KB, Miller TR, Putnam SL, De Leo D, Kleinig J, Stack S, Todd KH, Fraser DW.* Confronting death from drug self-intoxication (DDSI): prevention through a better definition. Am J Public Health. 2014; 104(12), e49-55

63. *Rossow I, Lauritzen G.* Balancing on the edge of death: suicide attempts and life-threatening overdoses among drug addicts. Addiction. 1998; 94, 209-19.

64. *Roy E, Haley N, Leclerc P.* Mortality in a cohort of street youth in Montreal. JAMA. 2004; 292, 569-74.

65. Schwartz RP, Gryczynski J, O'Grady KE, Sharfstein JM, Warren G, Olsen Y. Opioid agonist treatments and heroin overdose deaths in Baltimore, Maryland, 1995-2009. American Journal of Public Health, 2013; 103(5), 917-22.

66. *Sherman SG, Han J, Welsh C, Chaulk P, Serio-Chapman C.* Efforts to reduce overdose deaths. American Journal of Public Health, 2013; 103(8), 1-2.

67. *Sordo L, Barrio G, Bravo MJ, Indave BI, Degenhardt L, Wiessing L, Ferri M, Pastor-Barriuso R.* Mortality risk during and after opioid substitution treatment: systematic review and meta-analysis of cohort studies. BMJ. 2017; 357, j1550.

68. *Stoové MA, Dietze PM, Jolley D.* Overdose deaths following previous non-fatal heroin overdose: record linkage of ambulance attendance and death registry data. Drug Alcohol Rev. 2009; 28(4), 347-52.

69. *Strang, J., Hall, W., Hickman, M., Bird, SM.* Impact of supervision of methadone consumption on deaths related to methadone overdose (1993-2008): analyses using OD4 index in England and Scotland. BMJ. 2010; *341*, c4851.

70. *Tobin KE, Latkin CA.* The relationship between depressive symptoms and nonfatal overdose among a sample of drug users in Baltimore, Maryland. J Urban Health. 2003; 80(2), 220-9.

71. *Vallersnes OM, Jacobsen D, Ekeberg Ø, Brekke M.* Patients presenting with acute poisoning to an outpatient emergency clinic: a one-year observational study in Oslo, Norway. BMC Emerg Med. 2015 ; 13, 15-18.

72. *Vingoe L, Welsch S, Farrell M, Strang J.* Heroin overdose among a treatment sample of injecting drug misusers: accident or suicidal behavior? J Subst Use. 1999; 4: 88-91.

73. *Waal H, Gossop M.* Making sense of differing overdose mortality: contributions to improved understanding of European patterns. Eur Addict Res. 2014; 20(1), 8-15.

74. *Werb D, Kerr T, Lai C.* Nonfatal overdose among a cohort of street-involved youth. J Adolesc Health. 2008; 42, 303-6.

75. *Wheeler E, Jones TS, Gilbert MK, Davidson PJ*; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Opioid Overdose

Prevention Programs Providing Naloxone to Laypersons - United States, 2014. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015; 64(23), 631-5.

76. *Wolfe S, Bouffard DL, Modesto-Lowe V.* The Opioid Crisis and the Physician's Role in Contributing to its Resolution: Step One--Prevention of Overdoses. Conn. Med. 2016; 80(6), 325-34.

77. *Zhang X, Wu LT.* Suicidal ideation and substance use among adolescents and young adults: a bidirectional relation? Drug Alcohol Dependence. 2014; *142*, 63-73.

Análisis de los inhibidores de las α-amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal.

Reig-Otero Y.[1], Mañes J. [1], Juan-García, C. [1], Manyes L. [1*]

[1] *Departamento de Medicina Preventiva i Salud Pública. Facultat de Farmàcia. Universitat de València.*

Resumen: Las plantas han desarrollado un sistema de resistencia a insectos y plagas mediante la síntesis de compuestos como los inhibidores de las α-amilasas y/o las proteasas digestivas, proteínas que actúan también contra las enzimas digestivas de mamíferos. Diversos estudios han demostrado su implicación en la activación del sistema inmune y posiblemente, en la sintomatología de patologías como la Sensibilidad al Gluten no Celíaca, siendo esta reacción proporcional al contenido en el cereal. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las diferentes estrategias para la extracción, purificación, detección y cuantificación de estas proteínas en el trigo y en otros cereales de la dieta actual. Esta revisión incluyó los métodos de análisis con espectrometría de masas del periodo 2000 – 2017, identificándose 114 artículos relevantes de los que se seleccionaron 26. Actualmente no existe un método estandarizado de control que permita determinar estas proteínas de forma clara, concisa y fiable.

Palabras clave:

Proteínas de las plantas; Inhibidores de las proteasas; Hipersensibilidad al trigo; Enfermedad Celiaca; Espectrometría de Masas.

Abstract: ***Analysis of Amylase/Trypsin's Inhibitors contained in wheat and other cereals: potential promoters of intestinal inflammation.***

Plants have developed a system of resistance to insects and pests through the synthesis of certain compounds such as alpha-amylase inhibitors and/or digestive proteases, proteins that can also act against digestive enzymes of mammals. Studies have shown their involvement in the activation of the immune system and possibly in the symptomatology of non-coeliac Gluten Sensitivity, being the reaction proportional to cereal content. The objective of this study was to review the different strategies used for extraction, purification, detection and quantification of these inhibitors in wheat and other cereals of the current diet. A review of the literature published between 2000-2017 on methods of analysis by mass spectrometry was carried out. 114 relevant articles were identified from which 26 were selected for review. At present, there is no standardized control method for the clear, concise and reliable determination of these proteins.

KeyWords:

Plant Proteins; Protease Inhibitors; Wheat Hypersensitivity; Celiac Disease; Mass Spectrometry

Introducción

Los cereales y las legumbres son la base alimentaria en nuestra dieta actual. Los cereales son la fuente más importante de nutrientes contribuyendo al 50% de las calorías de la dieta (Keraney, 2010). Las legumbres constituyen la fuente principal de proteínas en Latinoamérica, África y este de Asia (Flight y Clifton, 2006). Se han asociado varios compuestos de estos alimentos con mecanismos de defensa contra la depredación de insectos y la resistencia a la infección, como la familia de los inhibidores de las α-amilasas y las proteasas, proteínas que actúan inhibiendo las enzimas digestivas de los insectos y en algunos casos inhibiendo la de los mamíferos (Dang y Van Damme, 2015).Son moléculas tridimensionales formada por uniones disulfuro y se presentan como estructuras monómericas de 5 a 16 kDa, homodiméricas de 26 kDa o tetraméricas de 50 kDa (Franco et al., 2002). Debido a su naturaleza proteica son termolábiles, se desnaturalizan con el calor durante el cocinado, aunque se ha comprobado que no pierden totalmente la capacidad de inhibición (Zevallos et al., 2017; Pastorello et al., 2007).

Los primeros inhibidores aislados fueron el inhibidor Kunitz y Bowman-Birk de la soja en 1940 y el inhibidor de la α-amilasa de cereales (Kneen y Sandstedt, 1943; Kunitz, 1945; Bowman, 1946). Desde entonces se han identificado y caracterizado numerosos inhibidores en un amplio espectro de especies vegetales debido principalmente al interés en modificar su expresión para el control de las plagas o para tratar la diabetes y la obesidad (Vasil, 2007; Barrett y Udani, 2011; Dang y Van Damme, 2015). Recientemente se han vinculado los inhibidores de la α-amilasa y la tripsina (ATIs) del trigo y de otros cereales con diversas patologías gastrointestinales, como la Enfermedad Celíaca (EC) y la Sensibilidad al Gluten no Celíaca (SGNC), por ser fuertes activadores de la respuesta del sistema inmune innato (Junker et al. 2012; Zevallos et al., 2017; Reig-Otero et al., 2017).

En 1943 se observó por primera vez que una proteína del endospermo del trigo era capaz de inhibir la amilasa salival y desde que se aislaron en 1973, se han relacionado con reacciones de hipersensibilidad IgE, como el asma del panadero y la alergia al trigo, así como en reacciones alérgicas cruzadas entre el trigo y el arroz (Silano et al., 1973; Mills et al., 2004; Salcedo et al., 2011; Junker et al. 2012; Villalta et al., 2012). Desde entonces se han publicado estudios para entender su estructura, el mecanismo de inhibición y su efecto sobre el sistema inmunitario (Carbonero et al., 1999; Payan 2004; Salcedo et al., 2011; Altenbach et al., 2011; Huebener et al., 2015).

En base al estado de agregación se pueden encontrar varios tipos de inhibidores de la α-amilasa en el trigo (figura 1): monoméricos o proteínas 0.28, homodiméricos o proteínas 0.19 y 0.55, y los heterotetraméricos, referidos como proteínas CM. Los inhibidores de la tripsina son monoméricos o inhibidores CMx (Sherry y Casey, 1999).

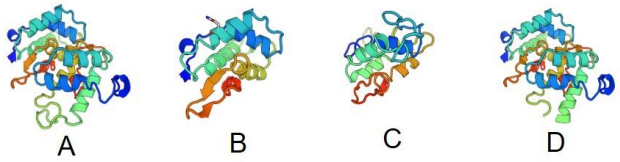

Figura 1: Representación de las estructuras 3D de varios inhibidores de la familia de los cereales: Inhibidor de la amilasa y la tripsina del trigo A) 0.53 B) 0.28 C) CM3 D) 0.19. Fuente: Swiss-Model Repository https://swissmodel.expasy.org/repository.

La posible implicación de estas proteínas en la EC, la SGNC y otras enfermedades inflamatorias, precisa disponer de las mejores técnicas instrumentales para su detección y cuantificación, así como de mecanismos para medir la actividad proinflamatoria del SGI (sistema gastrointestinal) de los cereales crudos y de los alimentos que los contienen. El mayor problema que existe es la inexistencia de procedimientos fiables de análisis y la ausencia de estudios interlaboratorio que los validen.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las técnicas más recientes de extracción, purificación, detección y cuantificación de los ATIs mediante espectrometría de masas (MS) principalmente del trigo y de otros cereales tanto en crudo como en alimentos procesados.

Metodología

Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura científica existente

*e-mail: lara.manyes@uv.es

relacionada con los ATIs de cereales. Para la revisión se consideró artículos desde el año 2000, utilizando bases de datos documentales de revistas indexadas como Medline, Scielo, Science Direct y Scopus, con el diagrama de flujo y criterios de búsqueda según se muestra en la figura 2. Finalmente se utilizaron 26 artículos para esta revisión bibliográfica.

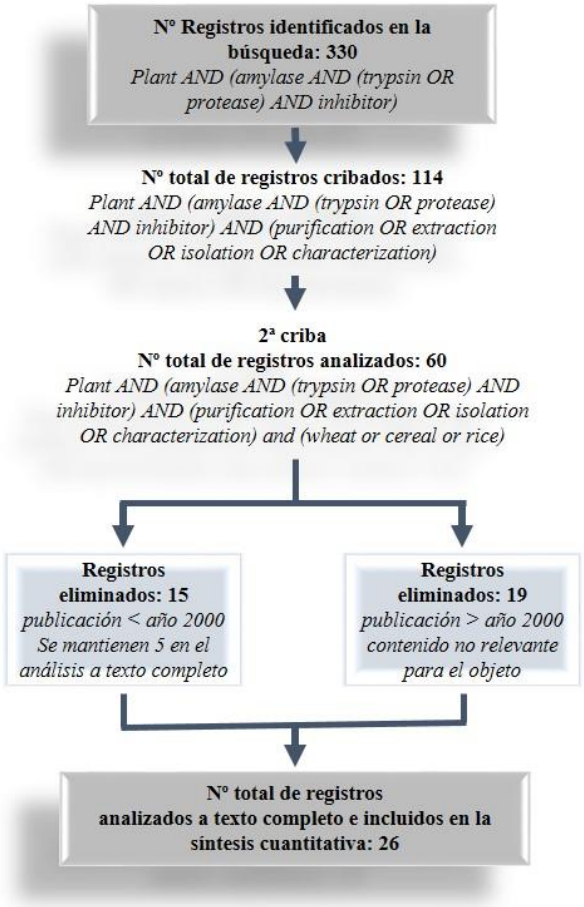

Figura 2: Diagrama de flujo y criterios de búsqueda utilizados para la revisión sistemática.

Resultados

Existen dos técnicas para detectar y cuantificar las proteínas con propiedades alergénicas en alimentos: MS y enzimoinmunoensayos. De estos últimos, la más utilizada es el ensayo ELISA basado en el reconocimiento de anticuerpos monoclonales o policlonales de una o más proteínas alergénicas, no requiere instrumental sofisticado ni altos niveles de experiencia, pero tiene desventajas como falsos positivos y baja sensibilidad (Croote y Quake, 2016). La MS es óptima cuando se requiere la confirmación de la composición, estructura y secuencia de aminoácidos. Tiene gran selectividad y alta sensibilidad, hay escasa posibilidad de falsos positivos, pero el coste es elevado y necesita personal cualificado (Monaci y Visconti, 2009; Mari et al., 2010).

En esta revisión se distinguen dos estrategias de análisis mediante MS (figura 3), una identifica los ATIs con potencial alergénico por inmunotransferencia, se aíslan y posteriormente se caracterizan por MS (Pastorello et al., 2007; Akagawa et al., 2007; Šotkovský et al., 2011; Lang et al., 2013; Goliáš et al., 2013), la otra estrategia identifica y cuantifica los péptidos característicos resultado de la digestión de las proteínas por técnicas de MS (Fontanini et al., 2007; Prandi et al., 2013; Uvackova et al., 2013; Flodrová et al., 2015; Satoh et al., 2016).

En la primera (figura 3A), una vez extraídas las proteínas, purificadas y digeridas con tripsina, se realiza un ensayo de inmunotransferencia con suero de pacientes sensibles. Las proteínas reactivas se analizan por MS, se comprueba el % de cobertura con patrones y se obtiene la secuencia mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En esta estrategia la clave es disponer del biomarcador que indique una alteración del sistema gastrointestinal (SGI). En la alergia al trigo se utilizan los anticuerpos IgE y en la EC los anticuerpos IgG y IgA, en el caso de SGNC todavía no hay biomarcadores característicos.

En la segunda (figura 3B), se cuantifican por MS las mezclas de los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas extraídas y purificadas. La cuantificación de proteínas en matrices complejas requiere la fragmentación en péptidos, esto trae consigo varias suposiciones: que el proceso de extracción y separación son óptimos, y que la digestión es completa y reproducible, es decir, existe una relación entre la concentración de los péptidos y de la proteína original (Ong y Mann, 2005; Li et al., 2017). Para dar valores cuantitativos del contenido en ATIs es necesario estándares semejantes a la muestra a analizar de los cuales se conozca su concentración en la matriz a estudiar, así como tener un criterio único en las unidades facilitando la comparación de los resultados de los diversos trabajos (Elliot et al., 2009; Sancho y Mills, 2010; Wang y Giese, 2017).

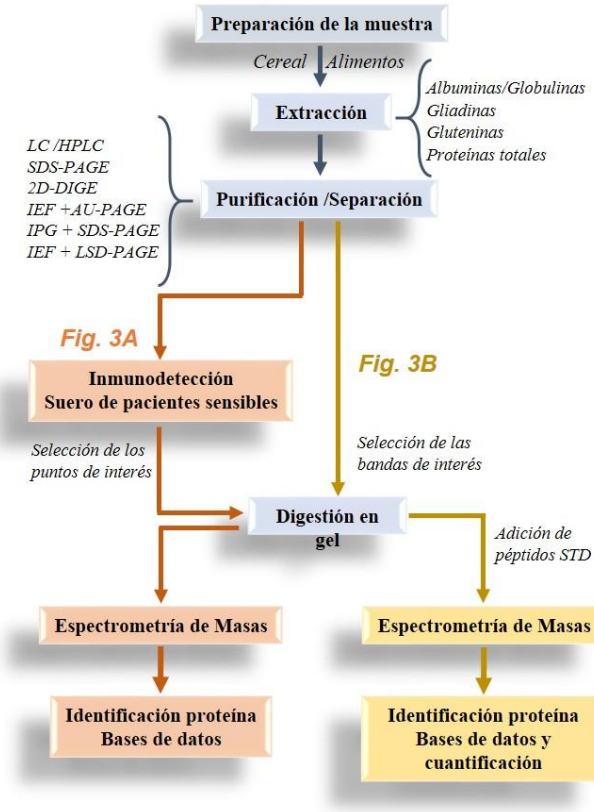

Figura 3: Estrategias de análisis utilizadas para la identificación y cuantificación de los ATIs en cereales

Revisión de las técnicas de extracción de los ATIs

En cualquier proceso analítico la eficacia del análisis depende en gran medida del método de extracción y de la pureza de la fracción extraída. Se realiza sobre el cereal molturado por separación de las proteínas en base a diferencias de solubilidad en varios solventes hasta conseguir la máxima pureza de la fracción concreta. Como se detalla en las tablas 1, 2 y 3, son mayoritarios los trabajos que identifican los ATIs sobre la fracción de las albúminas/globulinas (85%), aunque se hayan identificado en la fracción de las gliadinas y gluteninas, como el estudio realizado por Pastorello et al. (2007), donde se detectaron en las tres fracciones, siendo en las albúminas/globulinas donde se encontró la concentración mayor.

De acuerdo con la revisión realizada, la extracción se hace mayoritariamente de la fracción soluble en soluciones salinas (NaCl

1M, NaCl 0.5M, Tampón Fosfato Salino, etc.), albúminas/globulinas. Cuccioloni et al. (2016), optimizaron el método de extracción sobre las gliadinas usando un disolvente al 50% de isopropanol (1:5 p/v), seguido por una cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) con columnas cargadas de iones Cu(II). Este método presentó un 95% de recuperación de los ATIs frente al uso de la mezcla acetona/isopropanol. Por otra parte, Flodrová et al. (2015), valoraron el potencial alergénico de las proteínas sobre la fracción de las albúminas del trigo y la cebada en crudo y procesada. Según estos autores la mayoría de los alérgenos en alimentos son proteínas solubles en agua (Robinson y Pongracic, 2012).

Otro trabajo estudió la solución más eficaz para la extracción de alérgenos del arroz, concluyendo que los ATIs se encuentran mayoritariamente en la fracción de albúminas/globulinas y que la mayor concentración se obtiene con la solución compuesta de NaCl 1M en Tris–HCl 30mM a pH 8.0 o pH 6.8 (Akagawa et al., 2007). La identificación mejor de los alérgenos del arroz sobre las proteínas totales fueron las basadas en una mezcla de Tris–HCl, SDS, 2-mercaptoetanol y urea porque generaban menores interferencias en la cuantificación.

Tabla 1. *Métodos extracción, purificación e identificación de ATIs en distintas variedades de trigo.*

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Trigo *Triticum aestivum*	NH_4HCO_3 50 mM pH 7.8 y precipitación con $(NH_4)_2SO_4$.	FPLC	nUPLC-IMS-QTOF-MS	0,28; 0,53; 0,19; CM16; CM17; CM1; CM2; CM3; CMX1 y CMX30. 19 y 0.53 representa >50% de los ATIs	(Zevallos et al., 2017)
Mezcla 50% trigo *Triticum durum* y 50% trigo *Triticum aestivum* Muestra cruda y muestra cocida	*albuminas/globulinas:* 0.5 M NaCl, pH 8.5 en 0.05 M Tris-HCl *Gliadinas:* 70% (v/v) etanol *Gluteninas:* 2.5 ml of Tris-SO_4, pH 6.1, 10% (p/v) SDS, 2-mercaptoetanol y 50% (v/v) glicerol.	SDS-PAGE	MALDI-TOF ESI-MS/MS	*Albuminas/Globulinas:* CM1, 0.19, CM3, CM6 *Gliadinas:* CM2, CM16, 0,19 *Gluteninas:* CM2, CM3, CM16	(Pastorello et al., 2007)
Trigo *Triticum aestivum* cultivars Norin No. 61, Kitanokaori y Haruyokoi,	*Proteínas totales:* 8M urea, 40 mM Tris, and 4% CHAPS *Albuminas/Globulinas:* 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8) *Gliadinas:* 75% etanol *Gluteninas:* 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1% SDS y 0.5% DTT	IEF X LDS-PAGE	MALTI TOF/TOF	0.28, WDAI	(Akagawa et al., 2007)
Trigo *Tritium aestivum*	PBS – Tampón fosfato sódico	Ultrafiltración consecutiva (100k, 30k y 10k) IEF + RP-HPLC SDS-PAGE	MALDI MS/MS	0.19, 0.28, 0.53 CM17, CM1, CM2, CM16, CM3 CMX1/CMX3, IAAS	(Šotkovský et al., 2011)
Trigo *Triticum turgidum spp. durum*	Solución 0.5 M NaCl	SDS–PAGE	HPLC-LTQORBITRAP HPLC/ESI-MS/MS UPCL/ESI-MS	CM3	(Flodrová et al., 2015)
Trigo Emmer o farro *Triticum dicoccon* Schrank	Solución: 0.15 M NaCl y precipitado con $(NH_4)_2SO_4$	RP-HPLC SDS-PAGE	MALDI-TOF RP-HPCL/nESI-MS/MS	EDI-1, EDI-2	(Fontanini et al., 2007)
Trigo *Triticum aestivum* cultivar Viginta	*Gliadinas:* 1 mL de 50% (v/v) isopropanol *Gluteninas:* 1 mL de 50% (v/v) isopropanol, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) conteniendo 1% (p/v) DTT		UPLC-QTOF-MS^E	*Gliadinas:* CM16 (1.5 ng/µg) CM2 (3.4 ng/µg) *Gluteninas:* CM17 (6.8 ng/µg), CM1 (1.5 ng/µg), CM16 (1.7 ng/µg)	(Uvackova et al., 2013)
Trigo Triticum turgidum L. subsp. durum	Isopropanol (1:5 p/v)	IMAC (Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados)	HPLC	CM3	(Cuccioloni et al., 2016)
Harina de trigo *Triticum aestivum* cultivar Hokushin	8 M urea, 2% (v/v) Triton X-100, 0,001% Bromofenol azul (BPB)	IPG X AU-PAGE	MALDI-TOF		(Kitta et al., 2006)
Muestra de pasta comercial de trigo *Triticum durum* Muestra cruda y muestra cocida	*Proteínas totales:* 7 M urea, 80 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 *albuminas/globulinas:* 0.4 M NaCl, 0.067 M $HKNaPO_4$, pH 4.6.	SDS-PAGE	LC-ESI MS/MS	CM3, CM16, CM2	(Mamone et al., 2015)
Trigo *Triticum aestivum* L., cultivar Saratovskaya	Solución acetato 0.1 M y precipitado con $(NH_4)_2SO_4$	Cromatografía de afinidad con tripsina–Sepharosa SDS-PAGE		Se identifica un inhibidor bifuncional de 14kDa	(Islamov y Fursov, 2007)

Tabla 2. *Métodos de extracción, purificación e identificación de ATIs en distintas variedades de arroz.*

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Arroz (Oryza sativa cv.)	*Proteínas solubles en sales:* 30mM Tris–HCl pH 8.0/pH 6.8 y 1M NaCl *Insolubles:* 55-mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol y 11 mg/mL de DTT *Proteínas totales:* 50mM Tris–HCl (pH 7.5), 2% (p/v) SDS, 0.6% (v/v) 2-mercaptoetanol y 4M urea; 50mM Tris–HCl (pH 6.8), 4% (p/v) SDS, 20% (p/v) glicerol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 8 M urea	SDS–PAGE	MALDI-TOF	No se detallan en la publicación	(Lang et al., 2013)
Arroz crudo y cocido (*Oryza sativa L.*)	Dos soluciones: PBS – Tampón fosfato sódico: 0.9% NaCl, 0.02% NaH_2PO_4 y 0.05% Na_2HPO_4, pH 7.2 SDS – Tamoón dodecilsulfato sódico: 1% SDS, 10% glicerina, 5% 2-mercaptoetanol, y TRIS 50 mM	SDS-PAGE	MALDI-TOF/TOF - LIFT	RA5, RAG2, RAG1	(Goliáš et al., 2013)
Arroz, dos variedades japonesas (*Oryza sativa cv.* Nipponbare y Koshihikari), un arroz indio (Kasalath),y un arroz tailandés (Bleiyo)	*Soluciones salinas:* solución I, 1M NaCl; solución II, 0.5M NaCl en 30mM Tris–HCl (pH 6.8) *Kit comercial* P-PER (Thermo Fisher Scientific,) *Solución de urea:* 8 M Urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT	SDS-PAGE 2D-DIGE		RAG1, RAG2, RAG3, RAG4 y RAG5	(Satoh et al., 2016)
Arroz (*Oryza sativa* L. var. *japponica cv Nipponbare)*	Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$	IC - HPLC	JOEL JLC-300	RA17	(Izumi et al., 1999)

. **Tabla 3.** *Métodos extracción, purificación e identificación de ATIs en otros cereales.*

Muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Avena (*Avena sativa)*	50 mM NaCl y 50 % (v/v) propan-2-ol.	A-PAGE × SDS-PAGE	RP-HPLC/n-ESI–MS/MS	AATI-1, AATI-2, AATI-3	(Gazza et al., 2016)
Centeno (*Secale cereale*).	70% solución etanol (v/v) y precipitación $(NH_4)_2SO_4$	1. Diálisis 2. CII – DEAE 3. Las fracciones con actividad inhibitoria se purifican con CII – CM 4. SDS-PAGE	MALDI-TOF	Inhibidor homólogo en un 80% BTAI y 60% WTAI	(Iulek et al., 2000)
Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)	NaH_2PO_4 20 mM pH 6.9	N-LP-IEF SDS-PAGE	MALDI -TOF	CcdAI	(Gadge et al., 2015)
Ragi (*Eleusine coracana* Gaertn.)	0.15 M NaCl	Columna Trypsin-Sepharosa FPLC	MALDI-TOF-TOF-MS/MS	PKI RBI PKII	(Sen y Dutta, 2016)

Zevallos et al. (2017) utilizaron otros métodos de extracción para confirmar la activación del sistema inmune innato por parte de los ATIs donde utilizaron una solución de NH_4HCO_3 50mM sobre muestras de varios cereales y alimentos procesados y sin procesar. Tres extracciones consecutivas seguidas de la precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ y posterior diálisis consiguieron una pureza >60%.

La solución extractante afecta al método de análisis posterior, los agentes desnaturalizantes y concentraciones de sales elevadas para mejorar la extractabilidad son interesantes para el ensayo ELISA, pero tienen efectos negativos en la identificación por MS ya que influyen en la ionización del analito reduciendo considerablemente la intensidad de la señal (Kitta et al., 2006). En único ensayo interlaboratorio encontrado en esta revisión, Satoh et al. (2016), demostraron que, aunque la solución basada en urea (8 M Urea, 4% (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato) CHAPS, 60 mM DTT) consigue una mayor extracción de proteínas de semillas de arroz, con soluciones salinas basadas en NaCl se consigue la mejor representación de las proteínas en las bandas de electroforesis.

Métodos de separación y purificación de los ATIs

Como se observa en las tablas 1, 2 y 3, el 69% de los artículos utiliza la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), método que permite la separación de proteínas en una muestra compleja de acuerdo con su movilidad electroforética. El 31% emplea una segunda electroforesis, mayoritariamente de isoelectroenfoque (IEF), técnica que permite el fraccionamiento de proteínas en su estado nativo por su punto isoeléctrico (pI). En la mayoría de los casos se utiliza la LC de forma previa y/o posterior a esta etapa para mejorar del fraccionamiento.

Pastorello et al. (2007), con el fin de extraer y purificar los alérgenos en el rango de 9 kDa - 16 kDa del trigo realizaron una primera purificación de las albúminas/globulinas, en función del peso, por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las fracciones correspondientes a los picos individuales se concentraron y se pasaron por una columna de filtración en gel. Los diferentes picos obtenidos fueron analizados por SDS-PAGE y aquellos que contenían proteínas de 9 y 16 kDa fueron purificados, en base a su polaridad, por HPLC de fase reversa (PRC-HPLC), obteniendo, en muestras separadas, proteínas transportadoras de lípidos (LPTs) (9kDa) y los ATIs (12-16kDa) en cantidad y pureza suficiente para utilizarlas en los test de reactividad y confirmar su efecto alérgeno.

Akagawa et al. (2007), utilizaron una electroforesis bidimensional (E2D) para evaluar los alérgenos del trigo sobre la fracción total de las proteínas. Primero mediante IEF, la primera dimensión (1D), y después por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de litio (LDS-PAGE) para la segunda dimensión (2D). Concluyen que la E2D da información de hasta 18 proteínas IgE reactivas, entre ellas varios ATIs. No obstante, ciertos ATIs no se detectaron, posiblemente porque en la 2D las proteínas no migraron debido a la agregación, precipitación o asociación después de la 1D. Un trabajo anterior demostró que una electroforesis de electroisoenfoque con gradiente de pH inmovilizado (IPG) seguida por una electroforesis en gel de poliacrilamida-ácido acético-urea (AU-PAGE) permitía la detección de alérgenos alimentarios de bajo peso molecular, consiguiendo una resolución elevada especialmente para proteínas inferiores a 15kDa (Kitta et al., 2006). Según los autores, con este método, dos proteínas con tamaño similar pero diferentes cargas se pueden separar.

En otro estudio se valoró si la E2D diferencial cuantitativa con tinción fluorescente (2D-DIGE), tiene buena reproducibilidad para identificar y determinar las familias de alérgenos, los resultados obtenidos para la familia de los ATIs no eran consistentes (Satoh et al., 2016). Al igual que concluyen Akagawa et al. (2007), una vez que las proteínas alcanzan su pI en la 1D, los puentes disulfuro se regeneran induciendo la formación de macroagregados que luego se entrelazan y no pueden entrar en las fibras de gel de poliacrilamida en la 2D y migrar a su respectiva masa molecular.

Un estudio de 2011, optimiza el proceso de aislamiento combinando una separación por peso molecular, una electroforesis y una segunda purificación por cromatografía (Šotkovský et al., 2011). La separación por peso molecular se realiza por ultrafiltración consecutiva de las proteínas (100kDa, 30kDa y 10kDa). Posteriormente a la separación por SDS-PAGE, se somete cada una de las fracciones a una purificación por IEF. Con aquellas que mostraron complementariedad con los anticuerpos IgE de pacientes sensibles al trigo, se realizó una segunda purificación por HPLC. La ventaja de este procedimiento es que puede modificarse fácilmente para el aislamiento de diversos alérgenos cambiando el intervalo pI en la IEF o el perfil de elución del HPLC.

Métodos de detección de ATIs

La técnica ampliamente utilizada para identificación de las proteínas y determinación de la secuencia de aminoácidos es la MS debido a su capacidad de cuantificar con alta sensibilidad múltiples proteínas en matrices complejas (Monaci y Visconti, 2009; Croote y Quake, 2016). Antes de someter las proteínas a la detección por MS y una vez realizada la de separación, las bandas que se encuentran sobre 14-16kDa son utilizadas para una digestión enzimática, normalmente con tripsina, obteniéndose los péptidos característicos (Han et al., 2008; Monaci y Visconti, 2009). En un trabajo realizado para identificar el inhibidor CM3 en diferentes variedades de trigo, Prandi et al. (2013), observaron que la digestión con tripsina no generaba resultados satisfactorios. La ruptura del total de las proteínas se alcanzó con una digestión en dos fases, la primera con pepsina (0-180 min.) y la segunda con una mezcla de tripsina/quimiotripsina (180-420 min.).

Para la identificación y cuantificación de los ATIs se utilizan diferentes técnicas y combinaciones de MS como se observa en las tablas 1, 2 y 3. De los 17 artículos revisados que utilizan MS, el 74% utiliza fuentes de ionización *soft-ionization*, MALDI y electrospray, ESI.

Pastorello et al. (2007), utilizaron ambos espectrómetros para identificar los alérgenos más importantes del trigo. Después de una separación por SDS-PAGE y digestión enzimática, las bandas escindidas se analizaron mediante MALDI con detector tiempo de vuelo (TOF). En el caso de no identificar el péptido a partir del MALDI-TOF, se realizó la secuenciación *de novo* con un espectrómetro ESI-MS/MS en tándem. Mediante este proceso consiguieron identificar y secuenciar los inhibidores tetraméricos CM1, CM2, CM3 y CM16 del trigo crudo y cocido.

Ambas tecnologías se han utilizado también para aislar nuevos inhibidores. Por ejemplo, Fontanini et al (2007)., con el objetivo de identificar proteínas activas contra las amilasas humanas en la variedad de trigo Emmer o farro (*Triticum dicoccon* Schrank), utilizaron un MALDI-TOF para comprobar la similitud con los ATIs del trigo común (*Triticum aestivum*). Esta técnica no fue suficiente para discriminar determinados picos que no pudieron ser asignados a ningún fragmento conocido. Con un LC acoplado a un nano electrospray nESI-MS/MS se confirmó la existencia de dos inhibidores desconocidos hasta el momento EDI1 y EDI2.

Otro estudio sobre la avena (*Avena sativa*) identificó, usando una combinación RP-HPLC en tándem con un nESI–MS/MS, nuevos inhibidores en 11 especies de avena entre las cuales había genomas diploides y tetraploides con secuencias ortólogas a los ATIs del trigo. Treinta y siete AATI polipéptidos de alrededor de 14 kDa se agruparon en tres especies denominados AATI-1, AATI-2, y AATI-3 con estructuras primarias y pI diferentes. La secuencia de las proteínas AATI-1 y AATI-2 presentan un 55,5–60,0% de similitud con los ATIs CM1, CM2, y CM16 del trigo (Gazza et al., 2016).

Análisis cuantitativo de los ATIs mediante MS

Se han identificado tres trabajos que cuantifican los ATIs por MS. El primero lo hace de forma relativa utilizando la técnica de marcaje isobárico (iTRAQ). Esta técnica se había utilizado anteriormente para

el análisis de diferentes sistemas celulares y para describir los cambios de la expresión de proteínas relacionadas con el cáncer, el Alzheimer y otras enfermedades siendo muy novedosa para cereales. Flodrová et al. (2015), la utilizaron para la comparación cuantitativa de alérgenos de bajo peso molecular (CM16, CM3, CM1, CMe, 0.19, BDAI-1y LTP) en el cereal crudo y en el procesado (trigo frente a cuscús y cebada frente a malta). Primero utilizan el espectrómetro MALDI-TOF MS/MS para la identificación de las proteínas de cada una de las muestras. Posteriormente para su cuantificación relativa por pares (crudo/procesado), realizan un marcaje iTRAQ seguido con el análisis MALDI-TOF MS/MS, observándose la diferencia de señal los ATIs entre los alimentos procesados comparados con el cereal en crudo. Se confirma que en ambos cereales la cantidad de alérgenos de bajo peso molecular disminuye en los procesados, siendo más de un 70% en el cuscús, con la excepción de dos ATIs (CM16, CM3) que aumentan ligeramente en la malta, posiblemente por error analítico.

En el segundo trabajo se cuantifica por primera vez de forma absoluta el ATI CM3 del trigo en diferentes variedades, observando grandes diferencias dependiendo no solo de la variedad sino del área de cultivo (Prandi et al., 2013). Se realiza utilizando como estándar un péptido de síntesis isotópicamente análogo a los péptidos marcadores de las muestras de trigo. Para ello Prandi y col, utilizaron un HPLC acoplado a un sistema híbrido de espectrómetro de masas OrbiTrap® y trampa iónica (HPLC-LTQ-OrbiTrap) para verificar la identidad del inhibidor CM3 del trigo duro separado por SDS-PAGE. La secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos de la digestión enzimática del extracto del total de proteínas fue identificada con un HPLC/ESI-MS/MS. Uno de los péptidos se usó como patrón para la determinación cuantitativa en un LC de ultra resolución (UPLC) acoplado a un ESI-MS, permitiendo conocer el contenido de CM3 en diferentes cultivares y zonas de cultivo, observándose importantes variaciones desde 0,22 a 1,11 mg por gramo de trigo.

Por último, Uvackova et al. (2013), utilizaron un UPCL en tándem con un MS con analizador cuádrupolo acoplado a un analizador tiempo de vuelo (QTOF-MS^E) para el análisis cuantitativo de las proteínas alergénicas del trigo (Ishihama et al. 2005; Plumb et al., 2006). Los resultados son comparados con 76 proteínas alergénicas del trigo de diferentes especies, identificándose 15 proteínas del trigo potencialmente adversas a pacientes sensibles al trigo o celíacos, entre ellas varios ATIs (CM1, CM2, CM16 y CM17). La desviación estándar varía desde 11,3% al 165,7%, muy elevada comparada con la que se obtiene con el ensayo ELISA (< 6%), pero con valores de concentración para los ATIs similares a otros trabajos basados en MS.

Discusión

Los ATIs del trigo son unidades de polipéptidos de 12-16kDa que tienen una estructura secundaria con 4-5 puentes disulfuro, confiriéndoles una estructura 3D (Izumi et al., 1999; Carbonero et al., 1999). Esta configuración contribuye a su estabilidad, tanto en forma nativa como desnaturalizada, y a su elevada resistencia a las condiciones extremas del tracto gastrointestinal (Mills et al., 2004; Breiteneder, 2005). En los estudios revisados, se observa que los ATIs del trigo y de otros cereales no desaparecen después del procesado, aunque disminuyen su actividad proinflamatoria. Esta capacidad inflamatoria es multifactorial y depende de la variedad de partida, las condiciones de cultivo, el pretratamiento y el tipo de procesado (cocción, horneado, adicción de sal) y condiciones (temperatura, humedad, tiempo de permanencia) (Mills et al., 2004; Pastorello et al., 2007; Prandi et al., 2013; Zevallos et al., 2016). Todas estas variables podían ser moduladas y predeterminadas para desarrollar alimentos a base de trigo con menor contenido de ATIs y con menor poder de activación del sistema inmune.

Conocer los factores desencadenantes de la activación de la inmunidad innata en la EC con el consumo de cereales con gluten, dio lugar a un estudio que describe el papel de los ATIs en este mecanismo (Junker et al., 2012; Reig-Otero et al., 2017). Se observó que estas proteínas son potentes estimuladoras de los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés) en el intestino, concretamente el TLR4. Los TLR tienen un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria innata. Para comprobar esta actividad proinflamatoria de los ATIs, otro estudio verificó que es cien veces superior en cereales que contienen gluten y que se mantiene en el alimento una vez procesado, aunque es reducida frente al cereal sin procesar (Zevallos et al., 2017). La acción de los ATIs del trigo podría ser relevante para la explicación de la activación de la inmunidad innata en la EC, también podría explicar la activación de los síntomas de la SGNC y, posiblemente, de otras patologías del SGI (Reig-Otero et al., 2017). Zevallos et al. (2016). demuestran *in vivo* un aumento de los niveles de las células dendríticas cuando los ratones son alimentados en concentraciones 12 veces menores que el valor medio de los ATIs ingeridos en la dieta normal de un individuo adulto, siendo estos niveles dependientes de la concentración de los ATIs, y que además tienen un efecto coadyuvante de los síntomas en modelos con inflamación intestinal previa.

Respecto a la avena, Gazza et al. (2016), identifican diferentes inhibidores en distintas especies de este cereal, algunas llegan a tener un 60% de similitud con los ATIs del trigo. Esta similitud podría ser la causa de que la avena aun siendo un cereal sin gluten, dependiendo de qué variedad o en qué condiciones se procese, exhiba distinta inmunoreactividad en pacientes con EC poniéndose en cuestión la seguridad del consumo de avena por enfermos celíacos.

Las técnicas de identificación de los ATIs durante estos últimos diez años se han ido optimizado. Un salto cualitativo se observa con la MS en la identificación inequívoca de las proteínas, y con MS en tándem, en la obtención de la secuencia de aminoácidos. El primer trabajo que utiliza la MS en un cereal es en 2000, a partir de entonces se utiliza como técnica imprescindible para análisis (Iulek et al., 2000). Gracias a la MS se han podido aislar nuevos ATIs en diversos cereales y cuantificarlos, aunque no haya un procedimiento único o estandarizado. De los resultados de esta revisión sería de especial interés proponer un estudio colaborativo con el objeto de alcanzar un consenso en los métodos de análisis, así de disponer de los patrones o materiales de referencia imprescindibles para validar cualquier método usado por los laboratorios.

Como se observa en las tablas 1, 2 y 3, la mayoría de los artículos revisados analizan solamente la fracción de las albúminas/globulinas cuando los ATIs se encuentran presentes en todas las fracciones. Esto podría llevar a una pérdida de información a la hora de obtener datos cuantitativos. El método de purificación y separación utilizado es la electroforesis en 1D o 2D combinada con LC, aunque en estudios comparativos en la 2D se observan variaciones de intensidad que impiden realizar medidas precisas de la concentración de los ATIs, pero no del resto de proteínas alérgenas del arroz. Esta inconsistencia se explica en la regeneración de los puentes disulfuro de los ATIs después de la 1D formándose macroagregados impidiendo que migren a su respectiva masa molecular en la 2D (Akagawa et al., 2007; Satoh et al., 2016).

La LC es una técnica que en combinación con la electroforesis se utiliza para la separación y purificación de los ATIs. Permite buenas separaciones en un amplio rango de pesos moleculares, polaridad y solubilidad, y se utiliza tanto de forma preparativa como en alta resolución previamente a su identificación por MS.

Se han encontrado pocos estudios específicos sobre la identificación de ATIs en alimentos procesados y menos de su bioactividad sobre el sistema inmunitario innato. La posible implicación de estas proteínas en la patogénesis de enfermedades gastrointestinales como la EC, la SGNC y otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, hacen necesario disponer de las mejores técnicas instrumentales para la detección y cuantificación de los ATIs, así como mecanismos para medir su actividad proinflamatoria tanto en cereales crudos como en los alimentos procesados.

Conclusiones

En la última década han mejorado las técnicas de análisis de los ATIS gracias a la optimización de los procedimientos de extracción y purificación, y al uso de técnicas MS que han permitido su identificación inequívoca y su cuantificación.

Se ha utilizado mayoritariamente dos estrategias para aislar nuevos ATIs en diversos cereales. En la primera, se separan las proteínas reactivas de la fracción extraída mediante inmunoensayos, normalmente con anticuerpos IgE, para posteriormente separarlas y digerirlas con tripsina e identificar los péptidos característicos mediante MS. En la segunda estrategia, una vez extraídas, purificadas y digeridas, los péptidos se detectan con MS y, dependiendo el objetivo del trabajo, se cuantifican.

La extracción de los ATIs está basada en la solubilidad secuencial de las proteínas en diferentes solventes utilizándose mayoritariamente la fracción de las albúminas/globulinas (85%) aunque también están presentes en las gliadinas y gluteninas. Para la purificación se utiliza la electroforesis (69%), en una o dos dimensiones (31%) previamente a su detección en el MS con fuente de ionización MALDI de forma mayoritaria (42%).

No se existe todavía una metodología normalizada para disponer valores cuantitativos fiables del contenido de ATIs en alimentos, valores fundamentales dado su potencial efecto adverso para la salud. Se deberían realizar estudios interlaboratorio que permitan llegar a un consenso en los métodos utilizados, así como disponer de patrones de ATIs en diversas matrices, imprescindibles para validar cualquier método analítico.

Agradecimientos

Los autores declaran ningún conflicto de interés. Los autores agradecen a la Universitat de València el apoyo científico y económico de su investigación.

Bibliografía

1. *Akagawa M, Handoyo T, Ishii T, Kumazawa S, Morita N, Suyama K*. Proteomic analysis of wheat flour allergens. J Agric Food Chem. 2007; 55(17): 6863-6870.
2. *Altenbach SB, Veshel WH, Dupont FM*. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. BMC Res Notes. 2011; 4, 242.
3. *Barrett ML, Udani JK. A* proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (Phaseolus vulgaris): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. Nutr J. 2011; 10, 24.
4. *Bowman DE*. Differentiation of soy bean antitryptic factors. Proc Soc Exp Biol Med. 1946; 63(3), 547-550.
5. *Breiteneder H., Mills EN*. Molecular properties of food allergens. J. Allergy Clin Immunol. 2005; 115(1), 14-23.
6. *Carbonero Z, García P, Olmedo F*. A multigene family of trypsin/α-amylase inhibitors from cereals. In: Sherry R, Casey R, editors. Seed proteins, Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999, p. 617-633.
7. *Croote D, Quake SR*. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. NPJ Syst Biol Appl. 2016; 2, 16022.
8. *Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Ali I., Bonfili L., Cecarini V., Eleuteri A.M et al.* Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding. Food Chem. 2016; 213, 571-578.
9. *Dang L, Van Damme EJ*. Toxic proteins in plants. Phytochem. 2015; 117, 51-64.
10. *Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C.* Current trends in quantitative proteomics. J Mass Spectrom. 2009; 44(12), 1637-1660.
11. *Flight I, Clifton P*. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. Eur J Clin Nutr. 2006; 60(10), 1145-1159.
12. *Flodrová D, Benkovská D, Laštovičková M.* Study of quantitative changes of cereal allergenic proteins after food processing. J Sci Food Agric. 2015; 95(5), 983-990.
13. *Fontanini D, Capocchi A, Muccilli V, Saviozzi F, Cunsolo V, Saletti R. et al*. Dimeric inhibitors of human salivary α-amylase from emmer (Triticum dicoccon Schrank) seeds. J Agric Food Chem. 2007; 55(25), 10452-10460.
14. *Franco O, Rigden D, Melo F, Grossi-de-Sá M*. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases. Eur J Biochem. 2002; 269(2), 397-412.
15. *Gadge PP, Wagh SK, Shaikh FK, Tak RD, Padul MV, Kachole MS*. A bifunctional alpha -amylase/trypsin inhibitor from pigeonpea seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-efficacy against helicoverpa armigera. Pestic Biochem Physiol. 2015; 125, 17-25.
16. *Gazza L, Gazzelloni G, Taddei F, Latini A, Muccilli V, Alfieri M. et al.* The starch-bound alpha-amylase/trypsin-inhibitors in Avena. Mol Genet Genomics. 2016; 291(6), 2043-2054.
17. *Goliáš J, Humlová Z, Halada P, Hábová V, Janatková I, Tučková L*. Identification of rice proteins recognized by the IgE antibodies of patients with food allergies. J Agric Food Chem. 2013; 61(37), 8851-8860.
18. *Han X, Aslanian A, Yates JR.* Mass spectrometry for proteomics. Curr Opin Chem Biol. 2008; 12(5), 483-490.
19. *Heick J, Fischer M, Popping B*. Influence of sample extraction solutions on the detection of wheat proteins by mass spectrometry. J AOAC Int. 2012; 95(2), 388-393.
20. *Huebener S, Tanaka CK, Uhde M, Zone JJ, Vensel WH, Kasarda DD et al*. Specific nongluten proteins of wheat are novel target antigens in celiac disease humoral response. J Proteome Res. 2015; 14(1), 503-11.
21. *Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M.* Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. Mol Cell Proteomics. 2005; 4(9), 1265-72.
22. *Islamov RA., Fursov OV*. Bifunctional inhibitor of α-amylase/trypsin from wheat grain. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2007; 43(4), 419-423.
23. *Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch C, Rigden DJ, De Sá MFG*. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α-amylase inhibitor from Secale cereale (rye). Int J Biochem Cell Biol. 2000; 32(11), 1195-1204.
24. *Iulek J., Franco O.L., Silva M., Slivinski C.T., Bloch C., Rinden D.J. et al.* Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new a-amylase inhibitor from Secale cereale (rye). Int. J. Biochem. Cell Biol. 2000; 1195–1204.
25. *Izumi H, Sugiyama M, Matsuda T, Nakamura R.* Structural characterization of the 16-kDa allergen, RA17, in rice seeds. Prediction of the secondary structure and identification of intramolecular disulfide bridges. Biosci Biotechnol Biochem. 1999; 63(12), 2059-2063.
26. *Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA et al*. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation

via activation of toll-like receptor 4. J. Exp.Med. 2012; 209(3), 2095-2408.

27. *Kearney J.* Food consumption trends and drivers. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365(1554), 2793-2807.

28. *Kitta K, Ohnishi-Kameyama M, Moriyama T, Ogawa T, Kawamoto S.* Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid–urea polyacrylamide gel. Anal Biochem. 2006; 351(2), 290-297.

29. *Kneen E., Sandstedt RM.* An amylase inhibitor from certain cereals. J. Am. Chem. Soc. 1943; 65, 1247-1252.

30. *Kunitz M.* Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. Science. 1945; 101(2635), 668-669.

31. *Laborde CM, Zubiri I, Alonso-Orgaz S, Mourino-Alvarez L, Álvarez-Llamas G, Barderas MG.* The role of proteomics in the clinical laboratory. Rev Lab Clin. 2011; 4(4), 214-224.

32. *Lang GH, Kagiya Y, Ohnishi-Kameyama M, Kitta K.* Evaluation of extraction solutions for biochemical analyses of the proteins in rice grains. Biosci Biotechnol Biochem. 2013; 77(1), 126-131.

33. Li H., Han J., Pan J., Liu T., Parker CE., Borchers CH. Current Trends in Quantitative Proteomics - an update. J Mass Spectrom. 2017; 52(5), 319-341.

34. *Mamone G, Nitride C, Picariello G, Addeo F, Ferranti P, Mackie A.* Tracking the Fate of Pasta (T. Durum Semolina) Immunogenic Proteins by in Vitro Simulated Digestion. J Agric Food Chem. 2015;63(10), 2660-2667.

35. *Mari A, Ciardiello MA, Tamburrini M, Rasi C, Palazzo P*. Proteomic analysis in the identification of allergenic molecules. Expert Rev Proteomics. 2010; 7(5), 723-734.

36. *Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Sherry PR.* Structural, Biological, and Evolutionary Relationships of Plant Food Allergens Sensitizing via the Gastrointestinal Tract. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004; 44(5), 379-407.

37. *Monaci L, Visconti A.* Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. Trends Analyt Chem. 2009; 28(5), 581-591.

38. *Ong S, Mann M.* Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. Nat Chem Biol. 2005; 1(5), 252-62.

39. *Pastorello EA, Farioli L, Conti A, Pravettoni V, Bonomi S, Iametti S, et al.* Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. Int Arch Allergy Immunol. 2007; 144(1), 10.

40. *Payan F.* Structural basis for the inhibición of mammalian and insect α-amylases by plant protein innhibitors. Biochim Biophys Acta. 2004; 1696(2), 171-80.

41. *Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM. et al.* UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006; 20(13), 1989-1994.

42. *Prandi B, Faccini A, Tedeschi T, Galaverna G, Sforza S.* LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. Food Chem. 2013; 140(1), 141-146.

43. *Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L.* Non-Celiac Gluten Sensitivity: Nutritional management of the disease. Nutr. Clin. Diet. Hosp. 2017; 37(1), 179-190.

44. *Reig-Otero Y, Manyes L, Mañes J.* Amylase-trypsin Inhibitors in wheat and other cereals as potential activators of the effects of non-celiac gluten sensitivity (NCGS). J. Med. Food. 2017; 21(3), 207-214.

45. *Robison RG, Pongracic JA.* Food allergy. Allergy Asthma Proc. 2012; 33(3), 77-79.

46. *Salcedo G, Quince S, Diaz-Perales A.* Wheat Allergens Associated With Baker's Asthma. J Investig Allergol Clin Immunol 2011; 21(2), 81-92.

47. *Sancho AI, Mills EN.* Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterisation of food allergens. Regul Toxicol Pharmacol. 2010; 58(3), 42-46.

48. *Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K. et al.* Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens. Biosci Biotechnol Biochem. 2016; 80(11), 2198-2207.

49. *Sen S, Dutta SK. A* potent bidirectional promoter from the monocot cereal Eleusine coracana. Phytochemistry. 2016; 129, 24-35.

50. *Sherry R, Casey R.* Seed proteins. Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999.

51. *Silano V, Pocchiari F, Kasarda DD.* Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. Biochim Biophys Acta. 1973; 317(1), 139-48.

52. *Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cinová J, Šetinová I, Kainarová A et al.* A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. Clin Exp Allergy. 2011; 41(7), 1031-1043.

53. *Uvackova L, Skultety L, Bekesova S, McClain S, Hajduch M.* MSE based multiplex protein analysis quantified important allergenic proteins and detected relevant peptides carrying known epitopes in wheat grain extracts. J Proteome Res. 2013; 12(11), 4862-4869.

54. *Vasil IK.* Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (Triticum aestivum L.). Plant Cell Rep. 2007; 26(8), 1133-54.

55. *Villalta D, Longo G, Mistrello G, Amato S, Asero R.* A case of rice allergy in a patient with baker's asthma. Eur Ann Allergy Clin Immunol. 2012; 44(5), 207-9.

56. *Wang P, Giese RW.* Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. J Chromatogr A. 2017; 1486, 35-41.

57. *Zevallos V, Herencia I, Schuppan D. Tu*1381 Gluten-Free Crops Can Contain Proteins With Innate Immune Stimulatory Capacity: Influence of Environmental Factors. Gastroenterology. 2016; 150(4), S890.

58. *Zevallos V., Raker V., Tenzer S, Jiménez-Clavente C., AShfaq-Khan M., Rüssel N.* Nutricional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. Gastroenterology. 2017; 152(5), 1100-1113.e12.

ACTAS DE LAS VI JORNADAS DE FORMACIÓN EN TOXICOLOGÍA, VALENCIA 2018

Comité Científico: Dra. Mónica Fernández-Franzón. Dra. Guillermina Font, Dra. María José Ruiz, Dra. Houda Berrada, Dra. Emilia Ferrer, Dra. Ana Juan-García, Dra. Cristina Juan y Dr. Giuseppe Meca.

Comité Organizador: Dra. Lara Manyes, Dra. Laura Escrivá, Juan Manuel Quiles, Noelia Pallarés, Jorge Calpe Ruano, Carlos Luz Mínguez, Dionisia Carballo y Raquel Torrijos.

Organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) el 19 de Abril de 2018 en el Salón de Grados de la Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Colocación de carteles en el Hall de la Facultat de Farmàcia

CONFERENCIA

EL MODELO ANIMAL EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA. ALTERNATIVAS

Dra. Rosario Moyano Salvago
Catedrática de Toxicología. Departamento de Farmacología, Toxicología y, Medicina legal y Forense. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba

En la investigación básica y aplicada se requiere de la elección de un buen modelo y un adecuado diseño experimental para dar una respuesta fiable y reproducible.
La elección de los modelos animales adecuados en la investigación biomédica es fundamental a la hora de obtener datos predictivos para los humanos. Son herramienta fundamental para la investigación de las bases etiopatogénicas de una enfermedad y/o para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas biológicas que permitan nuevas estrategias de tratamiento de enfermedades.
Por otro lado, se requiere la máxima seguridad de los productos de consumo (alimentos, fármacos,…) y por tanto es necesaria la evaluación del riesgo para proteger la salud de la población. Pues bien, todos estos procesos conllevan estudios in vivo, y es esencial la elección de modelos animales adecuados.
En toxicología experimental con fines reguladores, existen normativas muy rígidas que deben ser seguidas, que exigen la evaluación de sustancias con diferentes requerimientos según su uso previsto, aplicando protocolos de ensayo estandarizados (OCDE,..). Así las autoridades en materia de seguridad alimentaria (Efsa, Aecosan) establecen para la autorización de nuevos alimentos una directrices de estudios y datos relativos a la inocuidad (ensayos de toxicidad de 28 días en roedores, toxicidad subcrónica de 90 días,..).
La ciencia de los animales de laboratorio ha alcanzado un alto nivel de desarrollo con el fin de lograr un trato humanitario a los animales y mejorar la calidad de las investigaciones. El diseño de los experimentos exige la definición detallada de las características genético-sanitarias y ambientales, así como una actitud ética y en la búsqueda de alternativas. Solo de esta manera se podrán obtener en las investigaciones resultados válidos, confiables, reproducibles y comparables.
En todos los casos, estos procedimientos con animales debe hacerse cumpliendo las normativas de protección de los animales de experimentación, deben ser autorizados por la autoridad competente (Directiva 2010/63/UE; R.D. 53/2013) y basándose en el principio de la 3Rs (reemplazo (métodos alternativos), refinamiento y reducción).

COMUNICACIONES ORALES

Moderadoras: *Dra. Houda Berrada Ramdani y Dra. Emilia Ferrer García.*

O1) HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD DE BIOCIDAS

Tolosa, J[1],[2]., *Goya, E[1]., Gozalbes, R[1]., de Julián-Ortiz, JV[3].*
[1] ProtoQSAR SL. CEEI Valencia. Avenida Benjamin Franklin, 12. Parque Tecnológico, 46980, Paterna, Valencia.
[2] Departamento de Medicina Preventiva y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avenida Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, España.
[3] Departamento de Química-Física, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avenida Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, España.

La predicción del riesgo de diferentes sustancias químicas, como son aquéllas con actividad biocida, es un aspecto esencial en la evaluación del riesgo por exposición a estas sustancias. Entre los distintos métodos predictivos conocidos destacan los métodos computacionales, los cuales presentan numerosas ventajas frente a ensayos de laboratorio, permitiendo reducir el número de ensayos con animales de experimentación, o incluso reemplazarlos, siendo completamente válidos a nivel regulatorio. La técnica computacional más utilizada consiste en el desarrollo y aplicación de los llamados modelos de relación cuantitativa estructura-actividad ("Quantitative Structure-Activity Relationship", QSAR), los cuales permiten predecir diversos parámetros biológicos y ambientales partiendo de la estructura química de la sustancia (Gozalbes et al., 2014). Estos métodos están siendo actualmente desarrollados en ProtoQSAR para su aplicación dentro del proyecto europeo COMBASE ("Computational tool for the assessment and substitution of biocidal active substances of ecotoxicological concern"), cuyo objetivo principal se centra en el desarrollo de una herramienta basada en la toxicología computacional que integrará modelos predictivos de la toxicidad acuática asociada a sustancias biocidas para cuatro niveles tróficos: bacteria, alga, crustáceo y pez. Esta herramienta permitirá predecir también los metabolitos, productos de degradación y de reacción generados durante el ciclo de vida de las sustancias activas, así como sus efectos ecotoxicológicos. De esta manera, COMBASE tendrá un carácter altamente innovador, y será la primera vez en Europa que se integrará una base de datos con información ecotoxicológica específica centrada en biocidas, y un conjunto de modelos computacionales que serán objeto de una validación experimental que confirme su eficacia y les otorgue validez regulatoria.
Palabras clave: QSAR; ecotoxicidad; BPR; evaluación del riesgo.
Agradecimientos: Programa LIFE+ de la Comisión Europea.
Referencias: Gozalbes R, de Julián-Ortiz JV, Fito-López C. Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH. Rev. Toxicol. 2014, 31, 157-167.

O2) EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN ZUMOS DE FRUTAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA (LC-MS/MS)

Carballo, D[1]., *Berrada, H[2]., Font, G[2]., Ferrer E[2].*
[1]Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción-Paraguay.
[2]Laboratorio de Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por muchas especies fúngicas filamentosas y son consideradas como uno de los mayores contaminantes de productos alimenticios. Las micotoxinas causan efectos adversos tales como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, actividad inmunosupresora, mutagenicidad, teratogenicidad, y carcinogenicidad. Debido a su toxicidad, la Comisión Europea ha establecido unos niveles máximos de contenidos en alimentos (Comisión Europea, 1881/2006). Las micotoxinas están presentes en diferentes alimentos como cereales, frutas, leche y bebidas alcohólicas y no alcohólicas y son a menudo moléculas muy estables, por lo tanto, podrían resistir a diferentes tratamientos térmicos aplicados a la elaboración de productos alimenticios (Kabak, 2009). El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de 16 micotoxinas (AOH, AME, TENT, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, OTA, ENA, ENA1, ENB, ENB1, BEA y STG) en zumo de piña, melocotón, naranja, manzana y mix de frutas por Micro-extracción Liquida-Liquida Dispersiva y su determinación por Cromatografía Liquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS-IT). La precisión del método fue evaluado por ensayos de recuperación a tres niveles,

expresados como desviación estándar relativa (RSD%) intra-día e inter-día. Se alcanzaron valores óptimos en términos recuperación (63-113%), reproducibilidad (RSDs <15%) y repetibilidad (RSDs>20%). Además, límites de detección (0.5-2.5) y cuantificación (1-5 µg/L) logrados fueron menores a los limites legislados. Se evaluó el efecto de matriz y se usaron curvas de calibración con la matriz para la cuantificación.
El método validado se aplicó con éxito al análisis de 30 muestras de zumos de frutas. Los resultados mostraron la presencia de al menos una micotoxina en 53% de todas las muestras. Las concentraciones medias detectadas en el zumo de piña fueron AOH y AME (3.23 y 9.07µg/L), en zumo de melocotón AOH (2.14 µg/L), AME (2.47 µg/L), ENB(1.28 µg/L), ENB_1 (1.78 µg/L), ENA y ANA_1 (<LOQ), en zumo de naranja AOH (3.59 µg/L) AME (9.54 µg/L), AFB_1 (7.7 µg/L) AFB2 (4.49), AFG2 (2.75) and OTA (6.25µg/L). La multi-contaminación por al menos dos micotoxinas fue observado en el 6% de las muestras analizadas.
Palabras claves: micotoxinas, zumos, LC-MS/MS

O3) ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DEL AITC SOBRE *A. FLAVUS IN VITRO* A NIVEL TRANSCRIPTÓMICO

Alonso-Garrido, M., *Quiles, J., Manyes, L., Meca, G.*
Laboratorio de Toxicología y Ciencias de la Alimentación. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot.

El alil isotiacianato (AITC) es un antifúngico volátil que provoca reducción del crecimiento fúngico y por tanto, disminuye la producción de micotoxinas. Además, su volatilidad le hace ser inocuo para la salud humana. El objetivo de este estudio es desarrollar una metodología que permita relacionar a nivel transcriptómico el tratamiento de Aspergillus flavus con AITC, a través del análisis de la expresión génica del grupo de genes responsables de la producción de micotoxinas. El diseño consiste en un experimento *in vitro* con tres concentraciones de *A. Flavus* fijas (10^3, 10^4, 10^5 ufc/placa) tratadas con un gradiente de concentración de AITC (0.25 y 0.75 uL/L) para determinar su eficacia en comparando con el control que no contiene AITC. El hongo crece a temperatura ambiente durante una semana, extrayendo posteriormente el ARN de cada una de las concentraciones de A. Flavus mediante un protocolo interno desarrollado en el laboratorio específicamente para esta aproximación. Se analizó la calidad y especificidad del ARN mediante espectrofotometría en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). A partir del ARN de las diferentes condiciones anteriormente mencionadas, se sintetizan las hebras de cDNA correspondiente mediante PCR con enzima retro transcriptasa inversa. Finalmente, se analizará la expresión génica para las diversas condiciones y se relacionará con la actividad del AITC y la producción de aflatoxina B1.
Palabras clave: AITC, aflatoxina B1, Aspergillus flavus, PCR.

O4) EMPLEO DE LA HARINA DE MOSTAZA AMARILLA COMO CONSERVANTE NATURAL DEL PAN DE MOLDE FRENTE A HONGOS MICOTOXIGÉNICOS

Torrijos, R.*, Quiles JM., Luz, C., Meca G.*
Laboratorio de Toxicología. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Av Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot.

El deterioro de los productos panarios representa una gran pérdida económica para la industria, además de suponer un riesgo para los consumidores debido a la producción de micotoxinas por parte de determinadas especies fúngicas. Los mohos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, por lo que es de gran dificultad prevenir su contaminación. Tradicionalmente en los productos de panadería se han empleado aditivos sintéticos como propionatos y sorbatos, sin embargo, la tendencia actual busca alternativas naturales que permitan su sustitución. En el presente estudio se evaluó cualitativamente la actividad antifúngica de extractos de harina de mostaza frente a cepas toxigénicas de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* y se determinó cuantitativamente la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Fungicida Mínima (MFC). Los extractos de harina de mostaza amarilla no autoclavada liofilizada presentaron actividad antifúngica frente a todas las cepas ensayadas. Asimismo, se evaluó el uso de la harina de mostaza amarilla (YMF) como ingrediente en el pan de molde para inhibir el crecimiento de los hongos micotoxigénicos *Aspergillus flavus* ISPA 8111 y *Penicillium nordicum* CECT 2320, así como la biosíntesis de aflatoxinas en el pan contaminado con *A. flavus*. Se observó una reducción del crecimiento fúngico empleando dosis de 6 g/kg y 8 g/kg de harina de mostaza amarilla en los panes contaminados con *A. flavus* y *P. nordicum*. Tras 7 días de almacenaje, no se evidenció crecimiento fúngico de *A. flavus* y *P. nordicum* a la dosis de 8 g/kg, permitiendo alargar la vida útil del producto en comparación con el pan control. Además, se logró una reducción del 78% de AFB_1 en los panes elaborados con 6 g/kg de YMF, mientras que con el uso de 8 g/kg no se observó producción de AFB_1 en el producto.
Palabras clave: Aflatoxina, harina de mostaza, vida útil, pan, LC-MS/MS

O5) ESTRATEGIAS DIETARIAS PARA LA REDUCCIÓN DE LA EXPSOCIÓN A ARSÉNICO INORGÁNICO

Címbalo A, *Clemente, MJ, Vélez D, Devesa V.*
Laboratorio de Elementos Traza. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC). Calle Agustín Escardino, 7, 46890 Paterna (Valencia).

La exposición crónica a arsénico (As) inorgánico aumenta la incidencia de diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y respiratorias, y diabetes tipo II. Los datos epidemiológicos proceden principalmente de poblaciones crónicamente expuestas al metaloide debido al consumo de agua contaminada y de alimentos cocinados con esta agua. Además de estas situaciones crónicas, se han descrito ingestas elevadas debido a un consumo frecuente de determinados productos alimentarios.
La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria recomienda disminuir la exposición dietaria a As inorgánico (EFSA, 2009). Esta reducción puede abordarse disminuyendo el consumo de los productos con elevados contenidos; sin embargo, en zonas donde es el agua la principal fuente de exposición resulta inviable. También puede plantearse la disminución del contenido de As en los alimentos, estrategia sencilla para el agua pero compleja en muestras sólidas. Otra alternativa, que ha mostrado eficacia en otros tóxicos, consiste en disminuir la entrada del contaminante a la circulación sistémica (biodisponibilidad). Se ha evidenciado que la biodisponibilidad de As es menor en productos vegetales que en disoluciones acuosas, indicativo de que algún componente de la matriz alimentaria reduce la cantidad de As que llega al torrente sanguíneo (Juhasz *et al*., 2008). El hecho de que componentes de la dieta puedan modular la absorción intestinal de las formas arsenicales podría constituir una línea de actuación para reducir la exposición a As.
El objetivo de este estudio es la búsqueda de componentes alimentarios capaces de reducir la biodisponibilidad de As inorgánico. Para ello se han empleado aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, que han permitido identificar compuestos de la dieta que pueden ser buenos candidatos para su futuro empleo en intervenciones poblacionales.
Palabras clave: arsénico inorgánico, biodisponibilidad, exposición, estrategias dietarias.
Referencias: [1]EFSA, European Food Safety Authority. (2009). [2]EFSA Journal, 7(10):1351, 1–199. Juhasz al et al. Chemosphere, 2008, 71, 1963-1969.

O6) ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA MITOCONDRIAL TRAS LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A BEAUVERICINA Y ENIATINA B EN CÉLULAS JURKAT

Escrivá, L., *Alonso-Garrido, M., Font, G., Manyes, L.*
Laboratorio de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain.

Beauvericina (BEA) y Eniatina B (EN B) son compuestos lipófilos e ionóforos que han demostrado citotoxicidad en varias líneas celulares

humanas (Mallebrera et al. 2018), así como alteración de la expresión del genoma humano en células Jurkat mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS) con principal afección de las vías de fosforilación oxidativa y cadena de transporte de electrones (Escrivá et al. 2018; Alonso-Garrido et al. 2018). El objetivo de este estudio es evaluar los efectos a nivel de transcriptoma originados por la exposición simultánea a BEA y EN B (0.1, 0.5 y 1.5 μM) en células Jurkat mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). El ARN de células control y tratadas fue extraído (Direct-zol™ RNA MicroPrep) y cuantificado (Agilent 2100 Bioanalyzer). Cuatro genes mitocondriales (MT-ND2, MT-ND4, MT-ND5, MT-CO3) fueron seleccionados en base a datos previos de NGS. Se diseñaron oligos específicos para cada gen (Primer-BLAST) cuyas condiciones para RT-qPCR (StepOne Plus Applied Biosystems) fueron optimizadas obteniendo productos únicos de amplificación para todos genes. La eficiencia de amplificación (E=125-152%) se determinó mediante triplicados de curvas estándar por diluciones seriadas del ADNc, obteniendo linealidad óptima (r^2>0.991). Las pruebas de RT-qPCR se realizaron por triplicado mediante el reactivo Fast SYBR Green observándose supresión de la expresión de los genes de estudio en consonancia con datos previos de NGS. Se confirma la alteración en la transcripción del genoma mitocondrial en células Jurkat tras la exposición a bajos niveles de BEA y EN B.

Palabras clave: Beauvericina, Eniatina B, Jurkat, Transcriptómica, RT-qPCR.

Agradecimientos: este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-43194-P; BES-2014-068039)

Referencias: [1]Mallebrera B, Prosperini A, Font G, Ruiz MJ (2018) *Food Chem. Toxicol.* 111 537-545. [2]Alonso-Garrido M, Escrivá L, Ruiz MJ, Manyes, L (2018) *Food Chem. Toxicol* (under review). [3]Escrivá L, Jennen D, Caiment F, Manyes L (2018) *Toxicol. Lett.* 284, 213-221.

COMUNICACIONES TIPO CARTEL

C1) LOS ESTEROLES VEGETALES INCREMENTAN EL EFECTO ANTICANCERÍGENO DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON

Álvarez-Sala, A[1]., *Ávila-Gálvez, MA[2]., Cilla, A[1]., Barberá, R[1]., Garcia Llatas, G[1]., Espín, JC[2]., González-Sarrías, A[2].*

[1]Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, España.

[2]Laboratorio de Alimentación y Salud. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo, Murcia, España.

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en el mundo. Los efectos secundarios adversos, así como la resistencia adquirida a agentes quimioterapéuticos como el 5-fluorouracilo (5-FU) son relativamente frecuentes, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias representa un gran desafío para reducir su uso sin mermar su eficacia[1]. En este sentido, los esteroles vegetales (EV), debido a su efecto anticancerígeno, podrían considerarse como una posible opción como adyuvantes en la quimioterapia[2]. El objetivo del estudio fue evaluar si los EV (β-sitosterol, campesterol y/o estigmasterol), a concentraciones colónicas estimadas tras ingerir una bebida enriquecida con EV, mejoran el efecto anticancerígeno del 5-FU en un modelo de células de cáncer de colon (Caco-2). Para ello, se evaluó, tras 72 h de incubación, la proliferación celular, el efecto sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis, la activación de caspasas 3, 8 y 9, la producción de ROS y el efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm)[3,4]. El co-tratamiento de los EV con 5-FU produjo un efecto antiproliferativo aditivo (79-85%) frente al tratamiento con 5-FU solo (59%). Además, se observó que la co-incubación de EV y 5-FU ejerció un mayor bloqueo en la fase S del ciclo celular y una mayor inducción de la apoptosis (temprana y tardía) con un aumento concomitante en la activación de caspasas *vs*. 5-FU solo. Sin embargo, los niveles de ROS y del ΔΨm no se vieron afectados. Concluimos que los EV podrían actuar como coadyuvantes del 5-FU en quimioterapia frente al cáncer de colon, aunque son necesarios estudios *in vivo* para confirmar este efecto beneficioso.

Palabras clave: Apoptosis;Cáncer de colon;Caco-2;Fitoesteroles;5-Fluorouracilo.

Agradecimientos: Andrea Álvarez-Sala es becaria predoctoral (ACIF/2015/251) y de una estancia de investigación (BEFPI/2017/048) de la Generalitat Valenciana (España).

Referencias: [1]Longley et al. 2003. Nat Rev Cancer, 3, 330-338. [2]Bradford & Awad, 2010. BioFactors, 36, 241-247. [3]González-Sarrías et al. 2015. Food Funct, 6, 1460-1469. [4]López-García et al. 2017. J. Funct. Foods3 9, 84-90.

C2) SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA EN EL PROCESADO Y ENVASADO DE CERVEZA: CONTROLES DE RUTINA.

Dasí-Navarro, *N., Juan-García, A.*

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.

La cerveza se obtiene a partir de la fermentación con levaduras, de un mosto elaborado principalmente con agua, malta y lúpulo. El consumo de cerveza está muy extendido en la sociedad y supone un producto de gran relevancia socio-cultural.

La industria cervecera se encarga de realizar controles rutinarios en el procesado, envasado y producto final que garantizan los requisitos de seguridad y calidad alimentaria de la cerveza. Se realizan controles en la materia prima (en los cereales) mediante medidas de friabilidad y granulometría; así como análisis químicos durante el procesado mediante la determinación de SO_2, α-amino-nitrógeno libre, sustancias amargas, y compuestos volátiles. Durante el envasado, se comprueban los sistemas de cierre de las latas y botellines, medidores en línea de CO_2, grado alcohólico y volumen de llenado, así como controles de peso. Finalmente, en el producto final, la cerveza, se realizan análisis microbiológicos, y de turbidez y estabilidad de la espuma.

Además de estos controles, una parte fundamental en seguridad alimentaria es la trazabilidad, y para ello se realizan los registros correspondientes de cada muestra analizada, con el fin de garantizar la posibilidad de seguimiento de todos los productos ante cualquier situación de alerta. Todos los controles rutinarios en la elaboración de cerveza permiten su caracterización organoléptica, obtener productos seguros y el cumplimiento de la legislación específica de la cerveza.

Palabras clave: cerveza, malta, industria alimentaria, calidad, seguridad.

C3) VALIDATION OF A QuEChERS EXTRACTION OF TEN MYCOTOXINS IN TIGERNUTS AND OAT BEVERAGE AND ANALYSIS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY

González, B., *Cisternino, C., Mañes, J., Juan, C.*

Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, València, Spain.

Nowadays, the consumption of vegetal beverages has increased as alternative of the consumption of milk. Oat beverage refers to a derived food from *Avena Sativa L*. seeds. Tigernuts beverage is made from the tuber *Cyperus esculentus*, which highest consumption in Europe is in the Valencian region of Spain. Although, both raw material have been not nearly as susceptible to Fusarotoxins contamination as wheat, barley and corn (Hamed et al., 2017), furthermore the increase consumptions among different season could be an important factor of diet exposure. The aim of the study was to validate a QuEChERS multimycotoxin analysis method (3-acetyldeoxynivalenol: 3ADON; 15-acetyldeoxynivalenol: 15ADON; toxin T-2 and HT-2; zearalenone: ZEA, enniatins: ENA, A1, B, B1 and beauvericine: BEA) in tigernuts and oat drink using a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was validated according to the European Commission

Decisions regarding analytical methods (2002/657/EC; 2006/401/EC) and acceptable values were observed for each studied parameter. The repeatability and reproducibility study (n=3) were performed spiking blank samples of both matrices at three levels (750 to 3.75 ng/mL). Accuracy expressed by percentage were 135-71% and 138-70% for tigernuts (ENB and ZEA) and oat (T-2 and ENB1) beverage, respectively. Matrix-matched linearity ranged from 0.92 to 0.999 for both matrices. A good intra-day precision (overall RSD <21%) was archived for tigernuts beverage and similar to the intra-day precision for oat beverage (overall SD < 24%). Limits of quantification for tigernuts and oat beverage ranged between 0.17 and 22 ng/Ml (ENB and 3ADON, respectively) and 0.7 and 22 ng/mL (ENB and ZEA, respectively). Ion suppression due to the co-eluting matrix components was observed in both matrices being lower than 36% for all the mycotoxins excepting 15ADON that presented ion enhancement in tigernuts (24%) and suppression in oat beverage (33%).

Keywords: Mycotoxins; Oat beverage; Tigernuts beverage; QuEChERS; LC-MS/MS.

Acknowledgments: AGL2016-77610-R.

References: Hamed A.H., Manzanares N., García-Campaña A.M., Gámiz- García L. Determination of *Fusarium* toxins in functional vegetable milks applying salting out assisted liquid-liquid extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Additives & Contaminants. Part A. (2017); 34:11, 2033-2041.

C4) MATERIA DE BIENESTAR ANIMAL EN EL GRADO DE VETERINARIA

Ares, I[1]., *Martínez, M[1]., Martínez, MA[1].*

[1] Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

La normativa en materia de "Bienestar Animal", aprobada por las instituciones comunitarias, es muy amplia, dado que toda la normativa sobre "Sanidad Animal" podría verse incluida en una guía sobre "Bienestar Animal", además también se deberían incluir otros ámbitos: las tres etapas del ciclo vital que son mantenimiento en la granja, transporte y sacrificio, el uso de animales en experimentación científica, la protección de pájaros en estado salvaje, el comercio de especies amenazadas y de sus productos, la limitación de las formas de pesca extractiva, y la limitación del uso de cepos o mantenimiento de animales salvajes en los parques zoológicos, entre otros. Por todo ello, para cumplir con los objetivos formativos sobre "Bienestar Animal" en el Grado de Veterinaria, se aborda la materia estructurada en dos criterios: el temático y el cronológico, que incluyen diversos capítulos, entre ellos se destacan: (1) aspectos legislativos básicos y cómo se controla la aplicación de esta normativa por parte de los diferentes Estados Miembros, la Comisión Europea y el Tribunal de Justicia; (2) la investigación científica en la conformación de la legislación sobre "Bienestar Animal" por parte del Consejo de Europa y por las instituciones comunitarias; (3) la investigación científica asumiendo las 'tres erres' (3R) reemplazo, reducción y refinamiento, como principios rectores del uso de animales en experimentación, considerando el principio de las 5 libertades como marco de referencia para garantizar buenos niveles de bienestar; (4) normativa de la Comisión Europea sobre el mantenimiento de los animales en las explotaciones, incluyendo debates del Parlamento Europeo relativos al transporte de los animales a larga distancia, forma de cría y sacrificio en el país de destino, bien en un ámbito veterinario más amplio o general (como la realizada con motivo del objetivo del mercado único); (5) por último se aborda la producción ecológica y la gestión de mercados.

Palabras clave: bienestar animal, biomarcadores, normativa.

C5) MYCOTOXINS OCCURRENCE IN TUNISIAN RABBIT AND POULTRY FEED

Ben Youssef, A[1].*, Oueslati, S[2,3]., Berrada, H[1]., Juan, C[1].*

[1] Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, València, Spain.

[2] Regional Field Crop Research Center of Beja (CRRGC).

[3]Laboratoire Materiaux, Molécules et Applications (LMMA), Institut Préparatoire aux Etudes Scientifiques et Techniques (IPEST), Tunisia.

Mycotoxins exposure in rabbit and poultry feeds are linked by contamination levels of the raw materials with different diet formulations, to highlight the important role of the stage of production and quality of raw materials used on mycotoxins levels. The European Union (EU) has established guidelines on raw materials and diets with differences linked to age of animal and stage of production (2003/100/EC; 2013/165/EC; 2013/165/EC). The Food Drug Administration (FDA) also established regulatory guidance that varies with the raw material, diet, effect of age and intended use, some of which sometimes differ from EU regulations (FDA, 2011). Our analysis focuses on mycotoxins for which maximum tolerated levels or regulatory guidelines exist, and for which sufficient contamination data on raw material are available (ENs, BEA, AFBs, OTA, AME, AOH, TENT, ZON, DON, 3ADON, 15ADON, NIV, NEO, DAS, T-2 and HT-2 toxin). Raw materials used in feed formulation vary considerably depending on the species of animal, and the stage of production. A validated method with QuEChERS extraction and chromatographic methods coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS and GC-MS/MS) was used for analyze twenty-two mycotoxins on 12 and 43 Tunisian rabbit and poultry feed samples, respectively.

All the analyzed feed were positive for at least one mycotoxin. *Fusarium* mycotoxins were the most prevalent led by DON (n=47), BEA (n=44) and ENB (n=46) and their values ranged between 58.9-249, 2.3-29 and 9.7-39 ng g^{-1}, respectively. None of the analyzed mycotoxins exceeded the maximal amounts set by EU legislations for animal feed (2003/100/EC; 2013/165/EC; 2013/165/EC). Rabbit and poultry feed samples were co-contaminated by more than one mycotoxin, 100% and 97.6%, respectively. Both feeds were co-contaminated with more than four different mycotoxins combinations. Overall, *Fusarium* emerging toxins were associated with the majority of the co-contamination, followed by DON and 3ADON. Mycotoxins contamination of Tunisian poultry feed and their co-occurrence were revealed for the first time in this preliminary study.

Keywords: Mycotoxins, poultry feed, co-occurrence, LC-MS/MS, GC-MS/MS.

Acknowledgments: AGL2016-77610-R.

References: [1]Commission Directive 2003/100/EC. Off. J. L. 2003;285:33-37. [2]Commission Recommendation 2006/576/EC. Off. J. L. 2006;229:7-9. [3]Commission Recommendation 2013/165/EC Off. J. L. 2013;91:12-15. [4]FDA, Food and Drug Administration U.S. Mycotoxin Regulatory Guidance, August 2011. Available: https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/ucm077969.htm (accessed on 09 April 2018).

C6) IMPLICATIONS OF OCHRATOXIN A AND BEAUVERICIN MYCOTOXINS IN DEREGULATION OF GLUTATHIONE CYCLE IN *IN VITRO* CELLULAR BASED ASSAYS: A REVIEW.

Juan-García, A[1]., *Ben Mahmoud, M[2].*

[1]Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia.

[2] Department of Biology, Private Polytechnic Superior Institute, Université Libre de Tunis.

Ochratoxin A (OTA) and Beauvericin (BEA) are mycotoxins produced respectively by *Aspergillus, Penicillium* and *Fusarium* fungus stains as secondary metabolites. Both contaminate food and feed stuffs and can be hazardous for human health by causing genotoxicity, cytotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity and immunotoxicity among others.

Glutathione is a tripeptide water - soluble molecule found in

micromolar concentrations in many tissues and cells. It is an antioxidant responsible of cellular homeostasis and maintenance of redox balance. It exists on oxidized (GSSH) and reduced form (GSH). GSH/GSSH ratio is the result of enzymatic activity mainly: glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). Amounts of the oxidation reduction cycle can indicate cellular redox status as well as a biomarker of oxidative damage; however, its deregulation can lead to cell death.

This review, is focused on the cytotoxic effect of OTA and BEA through the alteration of GSH/GSSH ratio and the enzymatic activity that modulate the formation of the two forms of intracellular GSH *in vitro* assays by: photometric determination, colorimetric analysis spectrophotometry assay and kinetic assays.

Keywords: OTA, BEA, glutathione, i*n vitro,* review.

Acknowledgements: This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-77610-R).

References: [1]Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Jozkowicz, A., Huebbe, P., Blank, R., Wolffram, S., Rimbach, G. (2008). *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2665–2671. [2]Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 1–12. [3]Klarić, M. Š., Daraboš, D., Rozgaj, R., Kašuba, V., & Pepeljnjak, S. (2010). *Archives of Toxicology*, 84, 641–650. [4]Klarić, M. Š., Pepeljnjak, S., Domijan, A. M., & Petrik, J. (2007). *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 100, 157–164.

C7) EMPLEO DEL SUERO DE LECHE FERMENTADO POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO CONSERVANTE NATURAL CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS EN LA ELABORACIÓN DE PAN DE PITA

Luz, C[1]., *Izzo, L[2]., Llatas, A[1]., Mañes, J[1]., Meca, G[1].*

[1]Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. España.

[2]Laboratory of Food Chemistry, Department of Pharmacy, University of Naples "Federico II" Italy.

El objetivo del trabajo reportado es estudiar la propiedad antifúngica del suero de leche (WM) fermentado con Bacterias Ácido Lácticas (BAL) sobre diferentes cepas de hongos toxigénicos y la posible aplicación de este como ingrediente natural para aumentar la vida útil del pan de pita [1]. Cuatro cepas de BAL obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), se emplearon para fermentar WM de cabra durante 72 h a 37 ºC. A continuación, se realizó un estudio de actividad antifúngica de los WM fermentados en medio sólido frente a un grupo formado por treinta hongos toxigénicos pertenecientes a los géneros *Fusarium, Penicillium* y *Aspergillus*. También se determinaron en medio líquido la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Fungicida (MFC) de cada uno de los WM fermentados. Los estudios de actividad antifúngica evidencian que los WM fermentados por BAL provocan una inhibición del crecimiento fúngico en medio sólido frente a las diferentes especies de hongos, y presentaron en medio líquido un rango de MIC y MFC de 2-250 mg WM fermentado/mL. Los panes elaborados sustituyendo el 100 % del agua por WM fermentado con mayor actividad antifúngica, e inoculados con *P. expansum* presentaron una reducción del recuento fúngico de 3.8-4.2 log UFC/g y un alargamiento de la vida útil de 5-6 días respecto al control sin aditivos. El empleo de ingredientes naturales, obtenidos a partir de subproductos de la industria láctea y el uso de BAL pueden ser una buena herramienta para promover la seguridad alimentaria y reducir el uso masivo de aditivos de síntesis.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, actividad antifúngica, suero de leche, pan.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610R), el Proyecto Europeo (H2020) MycoKey (GA 678781) y por el programa Atracció de Talent de la Universidat de València.

Referencias: Crowley S, Mahony J, van Sinderen D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology 2013, 33, 93-109.

C8) USE OF CINAMMALDEHYDE AS ANTIFUNGAL COMPOUND IN FOOD

Nazareth, TM., *Mañes, J., Meca, G.*

Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. España.

Filamentous fungi are important contaminants responsible for plants diseases and postharvest losses of fresh product like cereals, fruits, vegetables and their derivatives. Many of these fungi are mycotoxin producers such as genus *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium.* The mycotoxins are toxic secondary metabolites with deleterious effects for animal and human health. Effectively, the use of chemicals fungicides has been restricted because of their high residual toxicity, resistance and environmental risks. Recently, natural antifungal agents have been studied as an effective method for prevent or eliminate foodborne pathogens. Among these natural sources, the essential oils components have demonstrated a potential fungicide effect against a broad range of fungi as safer alternatives to reduce chemical fungicide application. Cinnamaldehyde (CM) is the main component of cinnamon oil that was certified by the Food and Agriculture Organization (World Health Organization) for use as a food-flavoring agent. Moreover, CM have been studied as antifungal compound to prevent spoilage in different kinds of aliments like fruit, grains and milk. In this review, we summarize the in vitro and on food antifungal activity of cinnamaldehylde as well as the new techniques for their application.

Keywords: Cinnamaldehyde, Safe Food Additive, Natural Antifungal, Essential Oil.

References: [1]Cava, R., Nowak, E., Taboada, a, Marin-Iniesta, F., 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against Listeria monocytogenes in pasteurized milk. J. Food Prot. 70, 2757–63. [2]Tarazona, A., Gómez, J. V., Gavara, R., Mateo-Castro, R., Gimeno-Adelantado, J. V., Jiménez, M., Mateo, E.M., 2018. Risk management of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in maize grains by bioactive EVOH films containing individual components of some essential oils. Int. J. Food Microbiol. 269, 107–119.

C9) ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ALIL ISOTIOCIANATO FRENTE A *ASPERGILLUS FLAVUS* Y *PENICILLIUM VERRUCOSUM* EN MAÍZ, TRIGO Y CEBADA

Quiles, JM., Torrijos, R., Nazareth, T., Mañes, J., Meca, G.

Laboratorio de toxicología. Departamento de Medicina Preventiva i Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Los isotiocianatos (ITC) son sustancias bioactivas características de las plantas de la familia *Brassicaceae*. Su actividad antifúngica se debe a sus fuertes propiedades electrofílicas que pueden reaccionar fácilmente con elementos nucleófilos asi como con varios grupos funcionales de muchas micotoxinas.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar las propiedades antifúngicas del compuesto bioactivo alil isotiocianato (AITC) contra el hongo productor de aflatoxinas (AFs) *Aspergillus flavus* (8111 ISPA) y el productor de ocratoxina A (OTA) *Penicillium verrucosum* (D-01847 VTT) en muestras de maíz, cebada y trigo.

Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema de silo simulado para escala de laboratorio que estaba compuesto por frascos de vidrio que contenían 300 g de cereales. La cebada y el trigo fueron contaminados con 1×10^4 esporas/g de *P. verrucosum* y el maíz con 1×10^4 esporas/g *A. flavus*. Los cereales se trataron con un disco de gel de hidroxietil celulosa al 12% al cual se añadieron 500 uL de AITC y se cerraron y se incubaron durante 30 días a 21 ° C. El grupo de control de cereales no recibió ningún tratamiento. Se determino la concentración de AITC en el espacio de cabeza, el crecimiento fúngico de los hongos inoculados, la reducción en la formación de AFs y OTA y la absorción del AITC en los cereales.

Los resultados mostraron una completa inhibición del crecimiento fúngico a los 30 días. En maíz contaminado con A. flavus, la cantidad de AFB1 detectada en los controles y las muestras tratadas fue de 8.07 y 0.12 ppb, respectivamente. Asimismo, en la cebada contaminada

con *P. verrucosum*, la cantidad de OTA presente en los controles y las muestras tratadas fue de 0.28 y 0.09 ppb, respectivamente. Las muestras de trigo contaminadas con *P. verrucosum* no mostraron una reducción significativa en la presencia de OTA.

Palabras clave: Alil isotiocianato, *Aspergillus*, cereales, micotoxinas, *Penicilium.*

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610R), el Proyecto Europeo (H2020) MycoKey (GA 678781) y por el programa Atracció de Talent de la Universidad de Valencia.

C10) DETECCIÓN DE ENIATINA B Y SUS PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACIÓN EN ORINAS DE NIÑOS Y ADOLESCENTES

Rodríguez-Carrasco, Y[1]*., Izzo, L[2]., Piemonte, C[2]., Gaspari, A[2]., Graziani, G[2]., Mañes, J[1]., Ritieni, A[2].*

[1]Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Farmacia, Universitat de València. España.

[2]Dipartamento di Farmacia, Università degli studi di Napoli Federico II. Italia.

Las eniatinas (Enns) son micotoxinas producidas por *Fusarium spp*. y son contaminantes ampliamente distribuidos en cereales y productos derivados. Entre las diferentes enniatinas identificadas, la Enn B es el análogo más relevante en cereales en Europa. Actualmente hay pocos datos sobre la detección de eniantinas y sus productos de biotransformación en tejidos y fluidos biológicos, lo que complica la evaluación del riesgo potencial relacionado con la exposición a enniatinas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar por primera vez la presencia de metabolitos de Enn B y sus productos de biotransformación (metabolitos de fase I) en muestras de orina de 36 niños y adolescentes italianos (intervalo de edad: 3-20 años) a través de un método analítico basado en espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). Los resultados mostraron presencia de eniatina B en el 80.5% de las muestras de orina analizadas en una concentración promedio de 0.0014 ng/mL. En línea con las observaciones *in vitro* con microsomas hepáticos humanos reportadas en la literatura científica, se detectaron tentativamente metabolitos de fase I pertenecientes a los grupos monooxigenados, *N*-desmetilados y dioxigenados en el 77.8%, 94.4% y 5.5% de las muestras analizadas aquí. Las concentraciones medias fueron 0.029 ng/mL para el grupo de metabolitos de la Enn B monooxigenados, 0.020 ng/mL para el grupo de *N*-desmetilados y 0.004 ng/mL para e grupo de dioxigenados. Los datos de este estudio piloto de biomonitoreo indican una ingesta frecuente de eniantinas en Italia, lo que respalda nuevos estudios toxicológicos para proporcionar una mejor base para comprender sus posibles efectos tóxicos en los seres humanos.

Palabras clave: eniatina B, metabolitos, fase I, orina, HRMS, niños.

Agradecimientos: Y. Rodríguez-Carrasco agradece a la Universitat de València el contrato post-doctoral "Atracció de Talent"

C11) PRESENCIA DE ZEARALENONA (ZEA) EN CÁPSULAS DE PLANTAS MEDICINALES

Pallarés, N., *Nacher, R., Sureda, L., Font, G., Ferrer, E.*

Laboratorio de Toxicología. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Av Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjasot.

El término micotoxina designa a compuestos altamente tóxicos resultado del metabolismo secundario de origen fúngico. Los géneros responsables de la producción de micotoxinas son principalmentes *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium. Fusarium* es el responsable de la producción de Zearalenona (ZEA) (Marín et al., 2013). La ZEA es un tipo de micotoxina que puede unirse a los receptores de estrógeno y puede causar alteraciones del tracto reproductivo dando lugar a trastornos reproductivos graves, infertilidad y cambios en los niveles séricos de progesterona (Tatay et al., 2014). Según la OMS por "planta medicinal" se entiende cualquier planta salvaje o cultivada usada con un fin terapéutico. Actualmente está aumentando el interés en el uso de cápsulas de plantas medicinales debido a sus propiedades terapéuticas y a que se trata de productos naturales. No obstante, su seguridad puede verse comprometida, debido a que pueden suponer un sustrato para el crecimiento de hongos micotoxigénicos, que pueden dar lugar a la producción de micotoxinas durante el cultivado, la cosecha, el almacenamiento y la distribución (Ashiq et al., 2013). La información acerca de la presencia de ZEA en suplementos de plantas medicinales, forma a la que el consumidor está expuesto directamente, es limitada. Veprikova et al. (2015) encontraron presencia de ZEA en suplementos de cardo mariano mayoritariamente con una incidencia del 78%. En este contexto, el objeto de este estudio es el análisis de la presencia de ZEA en 66 muestras de cápsulas de plantas medicinales (cardo mariano, valeriana, ginkgo, boldo, fucus, melisa, jengibre etc.). La extracción se llevo a cabo mediante el método QuEChERS y la determinación por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de masas en tándem con trampa de iones (LC-MS/MS-IT). Los resultados mostraron que ZEA fue detectada en las muestras con una incidencia del 11 % y contenidos que oscilaban desde 117 µg/kg hasta 3850 µg/kg.

Palabras clave: Zearalenona; cápsulas plantas medicinales; QuEChERS; LC-MS/MS-IT.

Agradecimientos: este trabajo forma parte de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad AGL 2016-77610R y por el programa de formación de personal investigador de carácter pre-doctoral: "Atracció de Talent" de la Universidad de Valencia.

C12) ESTUDIO DEL TRASPASO DE MICOTOXINAS A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA *IN VITRO*

Pallarés, N.*, Essid, N., Stampolidou, A., Ferrer, E., Manyes, L.*

Laboratorio de Toxicología. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Avda.Vicent Andrés Estelles s/n 46100 Burjassot.

Las micotoxinas son compuestos tóxicos resultado del metabolismo secundario de origen fúngico. La beauvericina (BEA), las enniatinas (ENNs) y la zearalenona (ZEN) son micotoxinas producidas por *Fusarium.* Las dos primeras clases son compuestos citotóxicos, con capacidad de penetrar en las células y alterar la homeostasis iónica intracelular y la última está relacionada con alteraciones del sistema reproductivo. Por otra parte, las aflatoxinas(AFs) son micotoxinas producidas por el género *Aspergillus*y están clasificadas como carcinógenos humanos (grupo 1, IARC) y sus efectos tóxicos comprenden genotoxicidad, teratogenicidad y actividad inmunosupresora. La lipofilicidad de estas micotoxinas las convierte en candidatas a atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), la cual consiste en una barrera de permeabilidad selectiva cuya función es separar la sangre circulante del fluido extracelular cerebral. El objetivo del presente trabajo es el estudio del posible traspaso de las micotoxinas (BEA, ENNs, AFs, ZEN) a través de la BHE. Para ello, se ensayó un modelo celular *in vitro* con células ECV304 (epiteliales) y C6 (gliales). Las células C6 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 50.000 cel/mL, las células ECV304 se sembraron a la misma densidad sobre unos insertos con membrana que se colocaron sobre la placa de 24 pocillos, de este modo se cocultivaron los dos tipos celulares a través de la membrana simulando así la BHE. La resistencia eléctrica transendotelial se midió a diario después del cuarto día de cocultivo para asegurarse de la integridad de BHE. Alrededor del día 10 de cocultivo, coincidiendo con la mayor integridad de la barrera se llevó a cabo el experimento usando las concentraciones de micotoxinas 0,1 y 0,01 µM y evaluando el porcentaje de traspaso tras 2 horas de incubación. En los primeros ensayos preliminares, tras la inyección en HPLC-MS/MS se observó el traspaso de las micotoxinas desde el compartimiento apical hasta el basal, alcanzado un porcentaje de de hasta el 40%.

Palabras clave: Micotoxinas; *in vitro*; HPLC-MS/MS; C6, ECV304, cocultivo.

Agradecimientos: este trabajo forma parte de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y

Competitividad AGL 2016-77610R y por el programa de formación de personal investigador de carácter pre-doctoral: "Atracció de Talent" de la Universidad de Valencia.

C13) CYTOTOXICITY OF NIVALENOL IN CELL CULTURE. A REVIEW

Fedeli, C[1]., *Ruiz, MJ[2].*
[1]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Italy.
[2]Department of Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Forensic Medicine and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.

Nivalenol is a type of B trichothecene mycotoxin produced by Fusarium fungi. This mycotoxin is commonly found in contaminated foods and feeds like cereal crops (wheat, maize, barley, oats, and rye) and processed grains (malt, beer and bread). Thus, Nivalenol represents a wide problem for human health. Indeed, several studies *in vitro* have shown its powerful cytotoxic activity, tested individually and in combination with other mycotoxins. The aim of this study is to summarize the data about the cytotoxic activity of NIV, performed with different cell lines, different exposure times and different assay.
Types of cells, chosen to determinate NIV cytotoxicity, are human (16HBE14o-, A204, A549, Caco-2, GES-1, hAECB, hAECN, HEp-2, HepaRG, HepG-2, HL-60, HUVEC, K562, Jurkat, RPMI 8826, TPH-1, U937), porcine (IPEC-1, IPEC-J2) and murine (3T3). Data show that the most studied cell line is Caco-2. From literature, we have found the IC_{50} values obtained after 24, 48 and 72 h of NIV exposure. The IC_{50} range at 24 h of exposure was from 0.4 μM in Jurkat human T lymphocytes cell line to 2.11 ± 0.87 μM in IPEC-1 intestinal porcine epithelial cell line-1. At 48 h of NIV exposure the IC_{50} range was from 0.2 μM in RPMI 8226 human myeloma cell line to 2.84 ± 0.05 μM in HepaRG human hepatoma cell line. At 72 h of NIV exposure the IC_{50} range was from 0.5 μM in Caco-2 colon carcinoma cell line to 1.8 μM in HUVEC human umbilical vein endothelial cells. In conclusion, cytotoxicity of NIV varies depending on the three parameters evaluated. According to the data, the cytotoxicity effect of NIV was higher in RPMI 8226 (0.2 μM) at 48 hours of exposure.

Keywords: nivalenol, cytotoxicity, IC_{50}.
Acknowledgment: Spanish Department of Economy and Competitiveness (AGL2016-77610-R).

C14) PRESENCIA, TOXICIDAD Y ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LAS MICOTOXINAS

Ana Bolea Lacueva, AB[1]., *El Ouardi, M[1*]., María José Ruiz, MJ[2].*
[1]Estudiantes del Grado de Farmacia de la UV.
[2]Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València.

La contaminación de alimentos es uno de los principales retos de Salud Pública, y las micotoxinas, como metabolitos secundarios que producen algunos hongos, constituyen una fuente de riesgo en diferentes etapas de la cadena alimentaria y nuestro papel como profesionales sanitarios es prevenir y controlar la presencia de dichas sustancias en los alimentos. Este trabajo es una revisión bibliográfica sobre las micotoxinas más frecuentes; aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, citrinina, zearalenona y tricotecenos. Para la búsqueda bibliográfica se han consultado web oficiales como AECOSAN, IARC o EFSA. Los resultados obtenidos han sido que estas sustancias causan micotoxicosis por mecanismos como la inhibición de la síntesis de proteínas y de ARN y ADN, y la alteración de la membrana celular. Dentro de la toxicidad aguda, se han detectado micotoxinas que pueden producir hemorragias y afectación a nivel gastrointestinal, renal, inmunológico, neurológico y/o hepático o infertilidad como la producida por la zearalenona. Sin embargo, es más relevante la toxicidad crónica, ya que pueden originar carcinogénesis, teratogénesis, genotoxicidad y toxicidad a otros niveles. La IARC clasifica las diferentes micotoxinas según su posible carcinogenicidad, siendo las aflatoxinas carcinógenas para el hombre (grupo 1 de la IARC). Por otra parte, en orden de reducir su ingesta a través de los alimentos, se han establecido Ingestas Diarias Tolerables (IDT) para algunas micotoxinas. En resumen, se puede concluir que las aflatoxinas son las más tóxicas, puesto que han demostrado ser carcinógenas para el ser humano. Aplicando el principio de buenas prácticas de higiene, así como la detoxificación, mediante técnicas físicas, químicas o biológicas se puede prevenir la contaminación con las micotoxinas en los alimentos y los efectos adversos de éstas sobre la salud humana y animal.

C15) INTOXICACIONES ALIMENTARIAS DE ORIGEN MARINO

Montañés, S., *Ruiz, MJ.*
Àrea de Toxicologia. Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l´Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, España.

En la actualidad, la incorporación de la gastronomía asiática en el mundo occidental, ha contribuido al incremento del número de casos de intoxicaciones debido a la ingesta de determinados pescados, así como la ingesta de moluscos crudos, no tratados correctamente o de procedencia desconocida. Este trabajo recoge información sobre las toxinas que más muertes causan a nivel mundial debido al consumo de animales marinos que las producen/contienen. Entre dichas toxinas se incluyen la tetrodotoxina, la ciguatoxina y la saxitoxina. La tetrodotoxina se encuentra en el pez globo (familia Tetraodontidae), proviene de bacterias que ha ingerido y con las que mantienen una relación endosimbionte. La ciguatoxina y la saxitoxina, ambas presentes en moluscos marinos, provienen de la acumulación de dinoflagelados tras las mareas rojas. Todas estas toxinas tienen gran afinidad por los canales de sodio dependientes de voltaje de las membranas de las células nerviosas y musculares, y son capaces de producir la muerte a concentraciones del orden de microgramos. Por otra parte, también se ha observado un aumento de intoxicaciones por consumo de alimentos marinos con problemas gastrointestinales debido a su inadecuada manipulación durante el cocinado. Así, la gempilotoxina es un éster ceroso para el cual el ser humano no dispone de enzimas idóneas para su digestión, causando síntomas digestivos, como la denominada keriorrea. La gempilotoxina se encuentra en el pez escolar (Ruvettus pretiosus y Lepidocybium flavobrunneum) y puede encontrarse en el sushi. En conclusión, el incremento de las intoxicaciones por consumo de alimentos marinos en los últimos años pone de manifiesto la necesidad de un mayor conocimiento de estas toxinas, una mejor manipulación culinaria dependiendo del alimento y un mayor control en este tipo de alimentos para disminuir el riesgo del consumidor**.**

Palabras clave: tetrodotoxina, ciguatoxina, saxitoxina, gempilotoxina, intoxicación alimentaria.
Agradecimientos: a mis compañeros Salva, Silvia y Teresa, por su gran aportación.

C16) CONTROVERSIA POR EL USO DEL ACEITE DE PALMA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Buendía S., *Colorado I., Ramón P., Scantamburlo S., Fernandez-Franzón, M.*
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

El aceite de palma ha desplazando a las grasas hidrogenadas en la elaboración de numerosos alimentos procesados. Al ser sólido a temperatura ambiente aporta solidez al alimento. Además, su punto de fusión cercano a la temperatura corporal, logra el efecto de deshacerse en la boca, por lo que ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria. En el siguiente trabajo se revisa la composición nutricional del aceite de palma crudo, y después de ser refinado, junto a las consecuencias sobre la salud de los consumidores, además del impacto ambiental que supone su cultivo. Por lo que concierne a la composición es un aceite vegetal, contiene casi un 50% de ácidos grasos saturados, sobre todo ácido palmítico. Los beneficios

nutricionales atribuibles a este aceite radican en el aporte de Vit. E y carotenos; pero, debido a los procesos físicos de refinación, gran parte de los tocoferoles y la totalidad de los carotenos son eliminados en el proceso. El aceite de palma crudo es rojo y además tiene un grado de acidez de aproximadamente 3.5%, por este motivo es necesario realizar a un proceso de refinado previo a su utilización. Durante este proceso se generan como contaminantes el 3-MCPD (monocloropanodiol), glicidol y sus esteres, son compuestos tóxicos para la salud humana y se han clasificado como posibles carcinógenos y mutágenos. Otro tema controvertido es el impacto ambiental que supone el cultivo extensivo de este aceite. Debido a sus propiedades tecnológicas existe una gran demanda de aceite de palma por parte de grandes corporaciones alimentarias, cosméticas y de agrocombustibles, que impulsa la destrucción a gran escala de turberas y selvas tropicales.

Referencias: Mancini, A.; Imperlini, E.; Nigro, E.; Montagnese, C.; Daniele, A.; Orrù, S.; Buono, P. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. Molecules 2015, 20, 17339-17361.

ACTAS DE LAS JORNADAS DE TOXICOLOGÍA ESPAÑOLAS E IBEROAMERICANAS, SEVILLA 2018

Comité Científico: Ana María Cameán, Rafael Balaña, Ana María Bermejo, Mónica Fernández, Fernando Gil, Ana Isabel Morales, Rosario Moyano, Silvia Pichardo, Juan Carlos Ríos, Francisco Soler.

Comité Organizador: Ana María Cameán, Ana Isabel Prieto. Guillermina Font, Ángeles Jos, Emma Martínez, María José Ruiz, Daniel Gutiérrez-Praena, Remedios Guzmán-Guillén, María Llana-Ruiz-Cabello, Sara Maisanaba, María del Pilar Mellado-García, Isabel María Moreno, Silvia Pichardo, María Puerto, Leticia Diez-Quijada, María Gracia Hinojosa, Concepción Medrano, María del Mar Merchán.

Organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) y el Área de Toxicología de la Universidad de Sevilla en el Salón de Grados de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla (US) el 29 de junio de 2018.

EDUCACIÓN EN TOXICOLOGÍA

Comunicaciones orales

Moderadora: *Dra. Mónica Fernández Franzón.*

ET-O1) CÓMO DESARROLLAR UN MOOC PASO A PASO EN EL CONTEXTO DE LA EDUCACIÓN SUPERIOR. EXPERIENCIA DEL PROYECTO TOX-OER.

Vicente-Vicente L[1,2,3] Prieto M[1,2,3], Pescador M[1,2], Casanova AG[1,2,3], Hernández-Sánchez MT[1,2,3], ***Morales AI[1,2,3]***

[1]Unidad de Toxicología, University of Salamanca, Spain. [2]Translational Research on Renal and Cardiovascular Diseases (TRECARD), University of Salamanca, Spain. [3]Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca, Spain.

En el campo de la Toxicología se ha desarrollado un curso masivo abierto *online* (MOOC) llamado TOX-OER (de sus siglas en inglés Learning Toxicology through Open Educational Resources), implementado bajo el marco del programa Erasmus+. Este proyecto, liderado por la Universidad de Salamanca, ha sido llevado a cabo por un consorcio de profesionales de muy diferente ámbito (expertos en Toxicología, Química, Nuevas Tecnologías, Pedagogía…) pertenecientes a 7 países. El desarrollo del mismo ha supuesto la utilización de recursos pedagógicos, técnicos y científicos. Por ello, y tras la finalización del mismo, se propuso escribir un libro (edición español-inglés) para compartir una visión técnica, pedagógica y personal, a fin de que pueda servir de guía a otros en este camino. El libro titulado "Retos en los Recursos Educativos Abiertos: Desarrollo del MOOC TOX-OER" comienza con una visión global de la Toxicología como ciencia emergente y fundamenta la necesidad de promover el conocimiento mediante el aprendizaje *online*. Se explican las bases pedagógicas de este tipo de cursos, el término de Recursos Educativos Abiertos (REAs), la utilización de licencias de *Creative Commons*, y los requisitos básicos para la construcción de un MOOC. Se detalla también por qué y cómo, Moodle ha sido la plataforma elegida en este proyecto. Para los guiones pedagógicos se incluye una guía básica de las herramientas que hay disponibles, sobre la variedad de recursos y actividades que pueden ser implementadas. En la visualización de un MOOC se expone desde la simple edición de un vídeo, a la utilización del canal YouTube. Se aportan las reflexiones sobre los cambios de paradigmas didácticos que suponen los MOOCs. Otro de los temas abordados es el referente al reconocimiento del aprendizaje adquirido vía MOOC. Por último, se plantean las bases del control de calidad en este tipo de cursos.

Este libro está disponible en: https://toxoer.com/intellectual-outputs/

Agradecimientos: El proyecto titulado "Learning Toxicology through Open Educational Resources" (Ref.: 2015-1-ES01-KA203-015957) ha sido financiado por el Programa Erasmus+.

Palabras clave: Toxicología, REAs, MOOC.

ET-O2) INNOVACIÓN DOCENTE EN LAS II JORNADAS DE TOXICOLOGÍA Y SOCIEDAD: SEGURIDAD ALIMENTARIA Y DROGAS DE ABUSO (FORO Y OLIMPIADA TOXICOLOGÍA)

Guzmán-Guillén R[1]*, Gutiérrez-Praena D[1], Medrano-Padial C[1], Mellado-García P[1], Díez-Quijada L[1], Hinojosa MG[1], Merchán M[1], Llana-Ruiz-Cabello M[1], Puerto M[1], Prieto AI[1], Pichardo S[1], Moreno IM[1], Maisanaba S[2], Jos A[1], Cameán AM[1]*

*[1]Área de Toxicología, Dpto. de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. [2]Área de Toxicología, Dpto. de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Pablo de Olavide, España.***

Las II Jornadas de Toxicología y Sociedad: Seguridad Alimentaria y Drogas de Abuso (Foro y Olimpiada de Toxicología) se celebraron el 23 de marzo de 2018 en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Es una actividad recogida dentro de un Proyecto de Innovación Docente de la Universidad de Sevilla, solicitado en base al éxito que tuvo la primera edición realizada el curso pasado. Estuvieron destinadas a alumnos de los Grados en Farmacia, Bioquímica y Criminología, y el Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría, en los cuales imparte docencia el Área de Toxicología. La duración fue de 10 horas organizándose las siguientes actividades: ponencias invitadas y una mesa redonda con conferencias impartidas por profesionales sobre diferentes campos de la Toxicología, así como comunicaciones orales de los alumnos sobre noticias de interés en Toxicología y Drogas de Abuso. Asimismo, se llevó a cabo una sesión de pósters, realizados por los propios alumnos. Como novedad, por la tarde tuvo lugar la "Olimpiada de Toxicología", en la que los alumnos participaron por equipos en diferentes rondas de juegos variados, con preguntas relacionadas con el temario impartido en clases, premiándose a tres finalistas. Las Jornadas se desarrollaron de forma muy satisfactoria, con una inscripción de 174 alumnos, y asistencia confirmada de 149. El éxito en asistencia y participación, así como la variedad de temas tratados y la interacción entre alumnos de distintas titulaciones, permitió el enriquecimiento tanto de los organizadores como de los asistentes.

Agradecimientos: Vicerrectorado de Estudiantes por la Ayuda de Innovación Docente concedida dentro del III Plan Propio de Docencia de la Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, Asociación Española de Toxicología (AETOX), y Delegación de Alumnos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Palabras clave: Innovación Docente, Toxicología, Seguridad Alimentaria, Drogas de Abuso, Olimpiada

Comunicaciones tipo póster

ET-P1) "MEDICAMENTOS PELIGROSOS AL VOLANTE", UN TALLER DE TOXICOLOGÍA DENTRO DEL PROGRAMA DE FORMACIÓN CONTINUADA "EDUCAFARMA".

Vicente-Vicente L[1,2,3] Prieto M[1,2,3], Pescador M[1,2], Casanova AG[1,2,3], Hernández-Sánchez MT[1,2,3], ***Morales AI[1,2,3]***

[1]Unidad de Toxicología, University of Salamanca, Spain. [2]Translational Research on Renal and Cardiovascular Diseases (TRECARD), University of Salamanca, Spain. [3]Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca, Spain.

Educafarma es un programa de formación continuada, gratuito, organizado por el Decanato de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca (USAL). Este programa está dirigido a alumnos/docentes de la rama biosanitaria. En el curso 2016-17, la Unidad de Toxicología de la USAL propuso un nuevo curso-taller titulado: "Medicamentos peligrosos al volante. Casos prácticos" con una duración de 2 horas. El objetivo principal de este curso es que los asistentes tomen conciencia sobre la problemática actual de los accidentes de tráfico relacionados con el consumo de medicamentos, para posteriormente aplicar los conocimientos adquiridos, en su etapa

profesional. Para ello, tras una breve introducción teórica, se discuten 8 casos prácticos. Como herramienta de ayuda se recomienda el uso de una aplicación (app) llamada "Fármacos y conducción" (de Faes Farma). A la 1ª edición (curso 2016-17) asistieron estudiantes de farmacia con edades comprendidas principalmente entre 21-23 años (60%), con distribución muy similar entre mujeres (60%) y hombres (40%). Al finalizar el taller, los asistentes valoraron varios aspectos puntuando de 1 a 5. La calidad del taller, de los ponentes, de la organización, la utilidad del taller y la satisfacción con la duración, fueron muy bien valorados, con notas superiores a 3 puntos. La satisfacción global con el taller se puntuaba de 1 a 10. Todas las notas obtenidas fueron iguales o superiores a 8 puntos. Cabe destacar que en la 2ª edición (curso 2017-18) el número de inscritos se triplicó. El taller de "Medicamentos peligrosos al volante" parece ser de gran utilidad para los estudiantes, tal como indican los resultados de las encuestas y el incremento en el número de inscritos. Mediante la realización de talleres de este tipo se abordan situaciones reales relacionadas con la Toxicología y además, ayudan al desarrollo de habilidades para la resolución de problemas.

Palabras clave: toxicología, medicamentos, conducción, docencia

ET-P2) INICIANDO A LOS ESTUDIANTES DEL GRADO EN BIOQUÍMICA (UEx) EN LA DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA

Oropesa AL*[1,2]*, *Soler F*[3,4]*, Pérez-López M*[2,3]*, Míguez MP*[2,3]

[1]*Unidad de Toxicología, Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura, Badajoz 06071, España.* [2]*INBIO G+C Instituto de Investigación, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, España.* [3]*Unidad de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, España.* [4]*IPROCAR Instituto de Investigación, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, España.*

Uno de los ámbitos en el cual el graduado en Bioquímica desarrolla su labor profesional es en el campo de la investigación. Por ello, el planteamiento de una actividad docente que permita el desarrollo de habilidades y destrezas para difundir el resultado de la investigación constituye una tarea que reporta interés y motivación a los estudiantes. La experiencia planteada en la asignatura de "Toxicología Molecular" se basa en la realización de varias actividades prácticas interconexionadas: (i) práctica en el aula de informática donde los estudiantes aprenden a trabajar con diferentes bases de datos bibliográficas a partir de las cuales obtienen información Toxicológica; (ii) prácticas en laboratorio basadas en la determinación de diferentes biomarcadores de actividad neurológica y de estrés oxidativo en diversas matrices; (iii) práctica de planteamiento de la elaboración de un póster, como soporte de difusión de los resultados de la investigación realizada, a partir de los datos obtenidos de las prácticas laboratoriales, y en la que se proporcionan las instrucciones sobre el formato que debe tener el póster y se lleva a cabo la organización de los grupos. Los grupos de 4 estudiantes deberán desarrollar un trabajo colaborativo distribuyéndose entre ellos las diferentes tareas para confeccionar el póster. Además, deberán presentar públicamente los objetivos, la metodología seguida en la investigación, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Con estas actividades prácticas, el estudiante desarrolla competencias transversales: aprendizaje autónomo, capacidad para aplicar conocimientos a la práctica, uso de las TICs como fuente de información, capacidad de análisis y síntesis de la información, capacidad de análisis estadístico de los datos y su interpretación, capacidad de comunicación escrita y oral. Dicha actividad es evaluable en el contexto de la calificación final de la asignatura. El papel de los profesores consiste en guiar y supervisar el trabajo de los estudiantes.

Agradecimientos: los autores agradecen la ayuda económica recibida para la participación en esta Jornada a la "Consejería de Economía e Infraestructuras. Gobierno de Extremadura" y a los fondos FEDER.

Palabras clave: Grado Bioquímica, investigación, prácticas, Toxicología Molecular, póster.

ET-P3) DIFUSION Y MANIFIESTO DE LAS POSIBILIDADES Y ACTIVIDADES QUE SE REALIZAN EN DOCENCIA E INVESTIGACIÓN TOXICOLOGICA EN IBEROAMERICA

E. de la Peña de Torres

Coordinador de la RITSQ. CSIC. c/ Serrano 115 dodo 28006 Madrid

En 2008 se puso en marcha la página web de la Red Iberoamericana de Toxicología y Seguridad Química (RITSQ), en ella se han registrado por internet más de 1.950 personas de 141 países, se han contabilizado un total de 90.653 sesiones, que se distribuyen anualmente en 61.308 usuarios y 189.721 el nº de visitas a páginas. Las actividades de la RITSQ se centran en la promoción y difusión de la información de diferentes los Congresos, Reuniones, en este Cartel presentamos los 100 carteles que se han presentados durante los años 2007 a 2017, presentados en Congreso y Reuniones de la AETOX y otras sociedades toxicológicas de Iberoamérica (Argentina, Chile, Colombia, Cuba, Brasil, México; Portugal, Uruguay); un centenar de carteles se han publicado en la página *web* de la RITSQ. El cartel número 100 presenta las diferentes actividades de la RITSQ, tanto de las visitas desde diferente países que se han realizado, refleja los 140 países de los seguidores de la Red; estas actividades y acciones de la RITSQ se han mostrado en los diferentes congresos, en carteles presentados por nosotros y por nuestros colaboradores. La RITSQ ha celebrado tres Reuniones específicas de la citada RITSQ en los congresos IUTOX celebrados en Montreal (Canadá) 2007, en Barcelona (España) 2010, y en Mérida (México) 2016, cuyos resúmenes se publican en nuestra página *web (http: //ritsq.org)*. La RITSQ viene también publicando los anuncios de los congresos de la IUTOX, de la Asociación Española de Toxicología, y de las sociedades de Toxicología de Argentina, Colombia, Chile, Cuba, Brasil, México, Portugal y Uruguay. La encuesta de la RITSQ realizada en mayo de 2016, fue publicada en la web, y permite un conocimiento del desarrollo en docencia e investigación de la actividad toxicológica en Iberoamérica (*http://www.ritsq.org/2017/01/03/resultados-de-la-encuesta-ritsq-sobre-oportunidades-de-formacion-e-investigacion-en-toxicologia-en-iberoamerica/*)

Palabras clave: visitas, información, difusión, seguridad, toxicología

Agradecimientos: Deseamos agradecer a todos los seguidores de la RITSQ por su permanente interés en la información difundida

ET-P4) EVOLUCIÓN DEL RENDIMIENTO ACADÉMICO DE LOS ESTUDIANTES DE TOXICOLOGÍA EN GRADO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS CON LA INCORPORACIÓN DE LOS SEMINARIOS COORDINADOS.

Berrada H, *Font G, Ruiz MJ, Juan A, Ferrer E, Fernández M*

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia

La implantación del Espacio Europeo de Educación Superior ha ido unida al aprendizaje centrado en el estudiante en la educación superior, caracterizada por métodos innovadores de enseñanza que involucran a los estudiantes como participantes activos impulsando la transversalidad horizontal y vertical entre materias, para desarrollar todas las competencias necesarias del grado. Se introducen diversas técnicas de aprendizaje activo para crear un entorno centrado en el alumno En este marco, el seminario coordinado es una de estas actividades formativas de carácter transversal en la que participan todas las asignaturas de la titulación del grado de ciencia y tecnología de los alimentos de la Universidad de Valencia para cumplir con las competencias generales y específicas citadas en la memoria del Verifica. Aproximadamente un tercio de los estudiantes matriculados en las asignaturas de toxicología alimentaria como toxicología laboral participaron de manera activa en los seminarios. Los otros compañeros eran responsables de elaborar preguntas a los presentadores así como cuestionarios basados en el material presentado. Todos los estudiantes participaban en los cuestionarios semanales y debates al final de cada tema presentado así cómo las

tutorías obligatorias. En el apartado de resultados se analiza el impacto de la introducción de los seminarios coordinados en la metodología docente y la evaluación sobre el rendimiento de los estudiantes. El análisis abarca el punto de vista de los estudiantes, su percepción acerca del interés suscitado para su futura profesión y, de una manera más objetiva se mide rendimiento académico con las notas del examen de la asignatura.

ET-P5) EMI-TOX: ENGLISH AS A MEDIUM OF INSTRUCTION IN TOXICOLOGY

Juan-García A, *Ruiz MJ, Berrada H, Ferrer E, Font G, Fernández-Franzón M*

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de València.

Higher education is immersed in the development of an international profile of students, as well as in controlling the specific competences to work in a globalized world. This phenomenon has meant to aim initiatives of improving the multilingual and intercultural communicative competences and the promotion of the graduates. In the academic year 2016/2017, the University of Valencia launched the PRIDA plan- Plan de Investigación, Internacionalització y Docencia en Inglés- for training and improving teachers' communicative and methodological competences, especially in their professional development, either as teachers and as researchers. In this sense, it was performed an intensive English Course for Teaching Purposes (ECTP) in a theoretical framework based on the methodology of English as a Medium of Instruction (EMI). This methodology is specific for teaching and performing research in English in a university-academic context, as well as a place for practice, discuss, create materials and implement innovative teaching methodologies in English. In this work, several teaching-learning strategies are presented for the subject of Toxicology taught in the fourth year of the Pharmacy Degree of the UV, after attending ECTP course in the EMI environment for the High Academic Performance Group (ARA) where students are taught in English.

Keywords: EMI, English, instruction, toxicology, teaching

ET-P6) APLICACIÓN DE MATERIALES UNIVERSITARIOS VIRTUALES PARA LA INVESTIGACIÓN Y EL APRENDIZAJE EN LOS SEMINARIOS COORDINADOS DEL GRADO DE NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA Y CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS EN LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Berrada H., *Fernández-Franzón M, Font G, Juan A, Ruiz MJ, Ferrer E*

Laboratori de Toxicología. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot-Valencia

La asignatura de Higiene Alimentaria es una asignatura troncal, con una carga lectiva de 4.5 créditos ECTS que imparte compartida el área de Toxicología de la Universitat de València durante el primer semestre a los alumnos que cursan 4º curso del Grado de Nutrición Humana y Dietética y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. En el plan de estudios, todas las asignaturas deben tener el mismo sistema de evaluación: evaluación de la docencia teórica y práctica, tutorías y seminarios coordinados. El seminario coordinado es una actividad formativa de carácter transversal en la que participan todas las asignaturas de la titulación. Se relaciona con las competencias generales de la misma: Realizar la comunicación de manera efectiva, tanto de forma oral como escrita, con las personas, los profesionales de la salud o la industria y los medios de comunicación, sabiendo utilizar las tecnologías de la información y la comunicación, especialmente las relacionadas con nutrición y hábitos de vida; conocer, valorar críticamente y saber utilizar y aplicar las fuentes de información relacionadas con nutrición, alimentación, estilos de vida y aspectos sanitarios; capacidad de interpretar datos relevantes; capacidad de transmitir ideas, problemas y soluciones dentro de su área de estudio, con perspectiva de género y desarrollo de habilidades para emprender estudios posteriores, de las respectivas memorias Verifica. Por ello, los seminarios no sustituyen parte del temario de teoría y no pretenden evaluar conocimientos previos de la asignatura. Se han realizado un total de seis seminarios coordinados en la asignatura. Todos han aplicado mUVie (Materiales Universitarios Virtuales para la investigación y el aprendizaje) y la mayoría de ellos utilizando Role Playing. El Role Playing es una técnica a través de la cual se simula una situación que se presenta en la vida real. El objetivo es imaginar la forma de actuar y las decisiones que tomaría cada uno de los personajes en situaciones diferentes. El grado de motivación y satisfacción por parte de los estudiantes que han realizado los seminarios y la valoración por parte de sus compañeros ha sido muy superior respecto a la metodología tradicional.

Palabras clave: Higiene Alimentaria, Grado de Nutrición Humana y Dietética, Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Seminario Coordinado.

SEGURIDAD ALIMENTARIA

Comunicaciones orales

Moderadora: *Dra. Silvia Pichardo Sánchez*

SA-O1) EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE EXTRACTOS DE ESTILBENOS PARA SU POTENCIAL USO COMO ANTIOXIDANTE EN LA INDUSTRIA DEL VINO.

Medrano-Padial C[1]*, Puerto M[1], Cantos-Villar E[2], Richard T[3], Cameán AM[1], Pichardo S[1].*

[1] Área de toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España. [2] Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro Rancho de la Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Cañada de la Loba (CA-3102) PK 3.1. 11471 Jerez de la Frontera, España. [3] AXE Molécules à Intérêt Biologique. ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin). 210 Chemin de Leysotte / CS 50008. F-33882 Villenave d'Ornon, France.

Actualmente, la industria vitinícola demanda la disminución o eliminación del uso de sulfuroso como aditivo en vinos dadas las implicaciones negativas que éste tiene sobre la salud de los consumidores. El efecto de conservación de sulfuroso en los vinos es bastante amplio y, hasta ahora, ninguna alternativa parece ser capaz, por si misma, de reemplazar completamente su uso. Los estilbenos son unos candidatos de gran interés para este fin debido a sus propiedades antioxidantes, encontrándose además de forma natural en el vino. Por ello, la citotoxicidad de dos extractos, ricos en estos compuestos, E1 con un 46% de riqueza en estilbenos y E2 con un 86%, ha sido evaluada en las líneas celulares Caco-2 y Hep-G2. Se llevaron a cabo tres ensayos: reducción de la sal MTS, rojo neutro (NR) y contenido proteico total (TP), en un rango de concentraciones de 0 a 100 µg/mL de ambos extractos durante 24 y 48 h de exposición. Los resultados mostraron un descenso de la viabilidad celular en todos los marcadores cuando las células fueron expuestas a ambos extractos. En el caso de E1 se observaron daños significativos desde 30 µg/mL tras ambos tiempos de exposición en ambas líneas celulares, dando lugar a una EC50 de 55,76 µg/mL en las células de colon y 31,18 µg/mL en las hepáticas tras 24h. Por otro lado, la exposición al E2 produjo una mayor citotoxicidad en la línea celular Caco-2, siendo MTS el biomarcador más sensible a 24 y 48h, mientras que para la línea celular Hep-G2 los resultados fueron similares a los obtenidos con el E1 (EC50= 31,91 µg/mL). En vista de los resultados obtenidos in vitro, sería necesario continuar con la evaluación de estos extractos para confirmar la seguridad de su uso como aditivos.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y al INIA por la financiación de este proyecto (RTA2015-00005-C02-02) y al Servicio de Biología del CITIUS por la asistencia técnica ofrecida.

Palabras clave: Citotoxicidad, Estilbenos, Vino, Caco-2, Hep-G2

SA-O2) ANALISIS DE MICOTOXINAS EN BEBIDAS DE CAFÉ POR CROMATOGRAFIA DE GASES (GC-MS/MS)

Carballo D[1], Font G[2], Ferrer E[2], ***Berrada H*** **[2]**
[1]Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción-Paraguay. [2]Laboratorio de Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por muchas especies fúngicas filamentosas y son consideradas como uno de los mayores contaminantes de productos alimenticios. Las micotoxinas causan efectos adversos tales como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, actividad inmunosupresora, mutagenicidad, teratogenicidad, y carcinogenicidad. Debido a su toxicidad, la Comisión Europea ha establecido unos niveles máximos de contenidos en alimentos (Comisión Europea, 1881/2006). Las micotoxinas están presentes en diferentes alimentos como cereales, frutas, leche y en bebidas de desayuno como cafés e infusiones y son a menudo moléculas muy estables, por lo tanto, podrían resistir a diferentes tratamientos térmicos aplicados a la elaboración de productos alimenticios. El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de 15 micotoxinas ((DON, 3AcDON, 15-AcDON, NEO, DAS, NIV, ZON, α-ZOL, β-ZOL,α-ZAL, β-ZAL, FUS-X, T-2, HT-2 y PAT) en bebidas de cafés por Micro-extracción Liquida-Liquida Dispersiva y su determinación por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). La precisión del método fue evaluada por ensayos de recuperación a tres niveles, expresados como desviación estándar relativa (RSD%) intra-día e inter-día. Se alcanzaron valores de recuperación (61-112%), reproducibilidad (RSDs <15%) y repetibilidad (RSDs>20%). Además, límites de detección (0.58-2.3) y cuantificación (1.95-7.81µg/L) logrados fueron menores a los límites legislados. Se evaluó el efecto de matriz y se usaron curvas de calibración con la matriz para la cuantificación. El método validado se aplicó con éxito al análisis de 20 muestras de bebidas de cafés. Los resultados mostraron la presencia de al menos una micotoxina en 60% de todas las muestras. Las concentraciones media de micotoxinas encontradas de 15-ADON, 3-ADON y NEO en las muestras de cafés fueron de 14.27, 16.17 y 28.62 µg/L.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77610-R) y al Programa Nacional de Becas de Postgrado en el Exterior Don Carlos Antonio López – República del Paraguay.

Palabras claves: micotoxinas, café, GC-MS/MS

Comunicaciones tipo póster

SA-P1) EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE UN EXTRACTO PRODUCTOR DE CILINDROSPERMOPSINA (*Aphanizomenom ovalisporum*) Y UN EXTRACTO NO PRODUCTOR (*Cylindrospermopsis raciborskii*) EN LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y

Hinojosa MG, ***Prieto AI,*** *Gutiérrez-Praena D, Jos A, Cameán AM*
Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, España.

Diversos estudios ponen de manifiesto la capacidad neurotóxica de algunas cianotoxinas, lo que aumenta su relevancia desde el punto de vista de la salud. En el caso de la cilindrospermopsina (CYN), una de las cianotoxinas más comunes encontradas en la naturaleza, existen algunos estudios llevados a cabo en distintos organismos tales como peces o roedores expuestos a extractos de cianobacterias productoras de CYN. No obstante, ningún estudio se ha llevado a cabo en células del sistema nervioso humano. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue investigar el posible efecto neurotóxico de un extracto de una especie productora de CYN como *Aphanizomenon ovalisporum*, en comparación con un extracto de una especie no productora de CYN, como *Cylindrospermopsis raciborskii*. Para ello, se empleó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para el presente estudio se realizaron diversos ensayos de citotoxicidad tales como la reducción de una sal de tetrazolio (MTS), la captación de rojo neutro (RN) y el contenido proteico (CP), usando un rango de concentraciones de 0-10 µg/mL CYN para el extracto productor, y el volumen equivalente a cada concentración del extracto no productor durante 24 y 48 horas. El biomarcador más sensible resultó ser el MTS, el cual dio lugar a unos valores de concentración efectiva media (CE_{50}) de 1,111±0,325 y 5,658±1,180 µg/mL para el extracto productor y el no productor a las 24 horas, y una CE_{50} de 0,691±0,165 y 5,164±1,620 µg/mL a 48 horas, respectivamente. Los resultados muestran un posible efecto neurotóxico de ambos extractos, si bien el efecto derivado del extracto no productor de CYN se debería atribuir a la presencia de otras sustancias, la presencia de CYN en el extracto incrementa el efecto neurotóxico del mismo.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE). Servicio de Biología del CITIUS de la Universidad de Sevilla**.**

Palabras clave: cilindrospermopsina, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, SH-SY5Y, citotoxicidad.

SA-P2) ESTRÉS OXIDATIVO COMO POSIBLE MENCANISMO DE ACCIÓN TÓXICA DE UN EXTRACTO PRODUCTOR Y NO PRODUCTOR DE CYN EN LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y

Hinojosa MG, ***Prieto AI,*** *Gutiérrez-Praena D, Jos A, Cameán AM*
Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, España.

La cilindrospermopsina (CYN), una cianotoxina emergente con actividad citotóxica, ha mostrado capacidad de producir también efectos neurotóxicos en diversas especies animales. No obstante, los estudios *in vitro* al respecto aún son muy escasos. Entre los mecanismos de acción descritos para la CYN, se ha demostrado su capacidad para producir estrés oxidativo en diferentes órganos. Sin embargo, para nuestro conocimiento, no existe ningún estudio que se haya llevado a cabo en células del sistema nervioso humano. El objetivo de este trabajo ha sido investigar la posible producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) así como la posible alteración de los niveles de glutatión reducido (GSH) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas a un extracto productor de CYN (*Aphanizomenon ovalisporum)* y a un extracto no productor (*Cylindrospermopsis raciborskii)* durante diferentes periodos de exposición (4, 8, 12 y 24 horas) y expuestas a las concentraciones CE_{50}, CE_{50}/2 y CE_{50}/4 obtenidas en ensayos de citotoxicidad previos. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de las ERO a partir de las 8 horas de exposición a todas las concentraciones ensayadas del extracto productor de CYN, aunque sí pudo verse una disminución de los niveles de GSH en todas las concentraciones ensayadas a las 4 horas. Por otro lado, en células expuestas al extracto no productor, se produjo un aumento de ERO a las concentraciones y tiempos de exposición más altos ensayados, aunque sí pudo apreciarse una disminución de los niveles de GSH a las 8 horas, habiendo una recuperación a las 12 horas, y volviendo a disminuir a las 24 horas en todas las concentraciones. Estos resultados indican, por primera vez, la capacidad de producir ERO por parte de la CYN en una línea celular neuronal humana, aunque este efecto podría verse aumentado por otros componentes presentes en el extracto, lo que explicaría el aumento de ERO en el extracto no productor.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE). Servicio de Biología del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

Palabras clave: cilindrospermopsina, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, SH-SY5Y, estrés oxidativo.

SA-P3) CITOTOXICIDAD DE ε-VINIFERINA Y RESVERATROL EN LA LÍNEA CELULAR HEP-G2

Medrano-Padial C[1], ***Merchán M[1],*** *Puerto M[1], Cantos-Villar E[2], Richard T[3], Cameán AM[1], Pichardo S[1].*
[1] Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. [2] Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro Rancho de la Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Cañada de la Loba (CA-3102) PK 3.1. 11471 Jerez de la Frontera, España. [3] AXE Molécules à Intérêt Biologique. ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin). 210 Chemin de Leysotte / CS 50008. F-33882 Villenave d'Ornon, France.

Los sulfitos se añaden tradicionalmente al vino como conservantes por su actividad antioxidante y antimicrobiana. Sin embargo, debido al aumento del número de alergias a éstos, despierta un gran interés su sustitución por compuestos naturales con propiedades similares. En este sentido, la utilización de extractos procedentes de la madera de la vid con alto porcentaje en estilbenos se está investigando con resultados prometedores. En el presente trabajo se evalúa la citotoxicidad de los componentes mayoritarios de uno de esos extractos, que presenta aproximadamente un 50,85% de ε-viniferina y un 21,98% de resveratrol, en vistas a garantizar la seguridad del consumidor. La evaluación toxicológica de ambos estilbenos se realiza en células Hep-G2 a las 24 y 48 horas de exposición mediante tres ensayos de citotoxicidad: reducción de la sal de tetrazolio (MTS), captación del colorante rojo neutro (RN) y contenido proteico total (PT). Las concentraciones de exposición fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 µg/ml para los dos estilbenos ensayados. En el caso de la ε-viniferina, el marcador más sensible fue el ensayo de MTS, en el cual la concentración efectiva media (EC_{50}) fue 28,28 µg/ml a las 24 horas y 17,85 µg/ml a las 48 horas. Para el resveratrol no se alcanzó el valor de EC_{50} a ninguna concentración tras 24 horas de exposición. Sin embargo, a las 48 horas se observa un descenso de viabilidad celular a partir de 30 µg/ml. En base a estos estudios de citotoxicidad podemos concluir que el resveratrol podría ser más seguro que la ε-viniferina, siendo necesarios más estudios de toxicidad para corroborar la seguridad del extracto como aditivo en vinos.

Agradecimientos: los autores de este trabajo agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) (RTA2015-00005-C02-02) la financiación de este trabajo. Así mismo, al Servicio de Biología del CITIUS por el apoyo técnico prestado.

Palabras clave: ε-viniferina, resveratrol, Hep-G2, citotoxicidad, vino.

SA-P4) CAPACIDAD DE PROTECCIÓN Y REVERSIÓN DE LOS EFECTOS DEL H_2O_2 DE DOS EXTRACTOS RICOS EN ESTILBENOS EN CACO-2 Y HEP-G2

Medrano-Padial C[1], *Puerto M[1], Cantos-Villar E[2], Richard T[3], Cameán AM[1], Pichardo S[1].*

[1] Área de toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España. [2]Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro Rancho de la Merced. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Cañada de la Loba (CA-3102) PK 3.1. 11471 Jerez de la Frontera, España. [3] AXE Molécules à Intérêt Biologique. ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin). 210 Chemin de Leysotte / CS 50008. F-33882 Villenave d'Ornon, France

El anhidro sulfuroso es uno de los aditivos más versátiles utilizado en numerosas industrias alimentarias, entre ellas la industria del vino. Sin embargo, existe una creciente preocupación por el consumo de alimentos que contienen este aditivo debido, principalmente, a los efectos alérgicos. Por ello, se está estudiando su sustitución por compuestos con propiedades antioxidantes, tales como los estilbenos. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de dos extractos ricos en estilbenos (E_1 (46%) y E_2 (86.1%)) en células Caco-2 y Hep-G2, teniendo en cuenta su capacidad para proteger las células ante la exposición a H_2O_2 y su potencial para revertir el daño inducido por esta molécula, mediante la medición de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las concentraciones utilizadas se establecieron en estudios de citotoxicidad realizados previamente basándose en los valores de concentración efectiva media (EC_{50}) para cada extracto y tipo de célula ($EC_{50/4}$, $EC_{50/2}$, EC_{50}). En el ensayo de protección, tanto el E_1 como el E_2 demostraron proteger a ambas líneas celulares a todas las concentraciones ensayadas, siendo más significativo el descenso tras la exposición de ambos extractos a su EC_{50}. De manera similar, en el ensayo de reversión se observaron cambios significativos con respecto al control desde los valores de $EC_{50/4}$ de E_1 y E_2 a ambos tiempos de exposición en Hep-G2. Por otro lado, la línea celular Caco-2 presentó menor capacidad de reversión, observándose cambios significativos sólo tras la exposición a H_2O_2 durante 2 h y posterior tratamiento con el valor de la $EC_{50/2}$ y EC_{50} de ambos extractos durante 24h de exposición. En vista de estos resultados, ambos extractos han demostrado interesantes resultados antioxidantes *in vitro*, por lo que se hace necesario realizar una evaluación más exhaustiva de estos extractos para confirmar su idoneidad y seguridad en su uso como aditivos.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y al INIA por la financiación de este proyecto (RTA2015-00005-C02-02) y al Servicio de Biología del CITIUS por la asistencia técnica ofrecida.

Palabras clave: Estrés oxidativo, Estilbenos, Sulfuroso, Hep-G2, Caco-2

SA-P5) PRESENTACIÓN DE LA RED NACIONAL DE EXCELENCIA EN NANOTECNOLOGÍA Y ALIMENTACIÓN FOOD (E-9)

Pérez E[1], Cajaraville M[2], Canals A[3], Cárdenas MS[4], Fernández ML[5], Fernández JF[6], ***Jos A[7],*** *Madrid Y[8], Martín O[9], Nerín C[10], Barat JM[1]*

[1] Universitat Politécnica de Valencia. [2] Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea. [3] Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. [4] Universidad de Córdoba. [5] Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. [6] Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas. [7] Universidad de Sevilla. [8] Universidad Complutense de Madrid. [9] Fundacio Universitat de Lleida. [10] Universidad de Zaragoza

La nanotecnología está suponiendo una revolución en muchos campos de la ciencia y la tecnología. No ajeno a estos movimientos, el sector alimentario es protagonista de numerosas innovaciones que implican en el empleo de nanotecnologías o materiales nanoestructurados. Dada su novedad, el empleo de estas tecnologías provoca una fuerte inseguridad fruto de la falta de estudios concluyentes sobre su seguridad y al vacío legal. Con el fin de aglutinar el conocimiento y know-how de las nanotecnologías aplicadas en alimentación y fomentar la colaboración entre grupos de investigación, se solicitó la creación de una red en base a la convocatoria de Redes de Excelencia del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, que fue concedida. La Red Nacional de Excelencia en Nanotecnología y Alimentación Food (E-9) pretende fortalecer las capacidades y recursos disponibles desde un punto de vista integral que comprenda tanto las aplicaciones de la nanotecnología en la alimentación, como los aspectos legales, analíticos, medioambientales y toxicológicos derivados de su uso. De esta manera, quiere convertirse en voz crítica, experta y de confianza tanto para las autoridades sanitarias y legisladoras, como para la comunidad científica, sector empresarial y los consumidores. La información actualizada sobre la Red está disponible en su página web https://www.rednanofood.es/.

Agradecimientos: Al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por la financiación recibida (AGL2016-81993-REDT).

Palabras clave: nanotecnología, alimentación, seguridad alimentaria.

SA-P6) CITOTOXICIDAD DE LA CILINDROSPERMOPSINA EN MODELOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

Pichardo S, *Jos A, Cameán A.M.*

Área de toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España

La Cilindrospermopsina (CYN) es una toxina producida por diferentes géneros de cianobacterias presentes en agua dulce, pudiendo llegar al hombre por diferentes vías. Existe un gran interés en conocer sus efectos tóxicos debido a su cada vez mayor presencia en la naturaleza. Entre los ensayos de toxicidad más frecuentes se encuentran los estudios de citotoxicidad basal in vitro, los cuales resultan de gran utilidad como primera herramienta para dilucidar su mecanismo de acción. Se ha realizado una revisión bibliográfica de dichos estudios y de su análisis se pueden extraer distintas observaciones. Así, el hecho de que existan modelos experimentales in vitro de distintos orígenes permite identificar los potenciales órganos de diana,

destacando las células hepáticas como las más sensibles a los efectos de esta cianotoxina. Además, existe una mayor sensibilidad en los cultivos primarios celulares en comparación con las líneas celulares establecidas. Entre los ensayos más empleados para el estudio de la citotoxidad basal destacan los que estudian el efecto sobre la mitocondria a través de la reducción de sales de tetrazolio. También hay diversos estudios que evalúan los mecanismos de muerte celular, bien por apoptosis o necrosis, empleando diferentes métodos entre los que destacan el uso de colorantes específicos. Por último, la exposición simultánea a CYN y a inhibidores del citocromo P450 reduce la citotoxicdad observada, mientras que la exposición junto a inductores la aumenta, lo que indica el importante papel de la biotransformación de la CYN en los efectos observados. Por todo ello, podemos concluir que los ensayos de citoxicidad basal resultan de utilidad como primer abordaje al estudio de los efectos tóxicos de la CYN, siendo necesario más ensayos que profundicen en su mecanismo de acción tóxica.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE).

Palabras clave: Citotoxicidad, cilindrospermopsina, *in vitro*, cianotoxina

SA-P7) CITOTOXICIDAD DE MICROSCISTINA-RR: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Diez-Quijada L, Gutiérrez-Praena D, ***Puerto M,*** *Llana-Ruiz-Cabello M, Jos A, Cameán AM*

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha mostrado su interés en conocer el perfil toxicológico de otras cianotoxinas distintas a microcistina LR entre las que se encuentra la microcistina RR (MC-RR). Esto es debido a su cada vez mayor presencia en agua y alimentos lo que puede suponer un riesgo potencial para el hombre y los animales. Por ello, en el presente trabajo, se ha realizado una búsqueda de toda la información disponible en la literatura científica sobre la citotoxicidad de MC-RR, al ser un método de screening básico en evaluación toxicológica *in vitro*. Para tal fin, se utilizaron diferentes bases de datos como Pubmed o ScienceDirect, acotando la búsqueda entre los años 2000 y 2017 con el objeto de obtener los artículos más recientes. Las palabras claves utilizadas fueron *MC-RR, cytotoxicity e in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron que son numerosos los estudios realizados en líneas celulares de diferente origen (animales y humanas). También son diversos los estudios realizados en líneas celulares de origen vegetal, como la línea celular de tabaco BY-2. Por lo general, los resultados obtenidos mostraron que los modelos experimentales de origen vegetal fueron menos sensibles a MC-RR que los de origen animal/humano y que de entre ellos los cultivos primarios eran más sensibles que las líneas celulares establecidas. Además de la disminución de la viabilidad celular inducida por MC-RR, se observó que la apoptosis fue el mecanismo de muerte celular más frecuentemente involucrado en la citotoxicidad. Todos estos datos son de utilidad para contribuir a la caracterización del perfil toxicológico de MC-RR con vistas a la evaluación del riesgo.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: Microcistina-RR, citotoxicidad, *in vitro*

SA-P8) EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA *IN VIVO* DE MICROCISTINA-RR: ESTADO DEL ARTE

Diez-Quijada L, ***Puerto M,*** *Gutiérrez-Praena D, Llana-Ruiz-Cabello M, Jos A, Cameán AM*

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.

Como consecuencia del cambio climático, cada vez es más común las proliferaciones en aguas a nivel mundial de cianobacterias, productoras de toxinas, como las Microcistinas (MCs). Las MCs son biotoxinas que se producen de modo habitual en el medio acuático, y en la actualidad, hay más de 100 congéneres distintos de MCs identificados, entre los que se encuentra Microcistina-RR (MC-RR). Aunque la MC-LR es la variante más usual en el medio ambiente y de la que se tienen más datos de toxicidad, últimamente la MC-RR ha predominado en diferentes lagos y embalses en diferentes continentes, siendo necesarios estudios acerca de su toxicidad. El objetivo del presente trabajo ha sido realizar una búsqueda bibliográfica de toda la información disponible sobre la toxicidad de MC-RR en diferentes estudios *in vivo*. Dicha búsqueda, fue acotada entre los años 2000 y 2017. Para ello, se utilizaron bases de datos como Pubmed o Science Direct. Las palabras claves usadas fueron *Microcystin-RR, oxidative stress, aquatic models, mammals, in vivo*. La mayoría de los estudios evaluaron la capacidad de MC-RR para causar estrés oxidativo, así como alteraciones histopatológicas en diferentes organismos tras la exposición a dicha sustancia. Estos estudios fueron realizados principalmente en organismos acuáticos al estar éstos en continuo contacto con MC-RR, siendo escasos los estudios realizados hasta la fecha en mamíferos. La información obtenida muestra que los peces son mucho más tolerantes a MC-RR que los mamíferos. Por otro lado, se ha evaluado la capacidad de MC-RR para causar alteraciones en el patrón de expresión de diferentes proteínas. Otros aspectos, sin embargo, tales como la mutagenicidad, genotoxicidad, inmunotoxicidad y toxicidad reproductiva inducidas por MC-RR están aún escasamente investigados. Por todo esto, sería necesario la realización de estudios adicionales en los que se evalúe la toxicidad de MC-RR en mamíferos/peces, permitiendo así conocer los riesgos, tanto en humanos como en el medio ambiente, derivados de la exposición a MC-RR.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: Microcistina-RR, estrés oxidativo, modelos acuáticos, mamíferos, *in vivo*

SA-P9) ALTERACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2 POR CILINDROSPERMOPSINA, MICROCISTINA-LR Y SU MEZCLA

Gutiérrez-Praena D[1], *Moreno FJ[2], Pichardo S[1], Jos A[1], Cameán AM[1]*

[1] Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, España. [2] Área de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes s/n, 41012 Sevilla, España.

Cilindrospermopsina (CYN) y Microcistina-LR (MC-LR) son cianotoxinas con impacto en Seguridad Alimentaria, ya que pueden encontrase en la cadena alimentaria o a través del agua de bebida, pudiendo afectar a los seres humanos. Desde el punto de vista toxicológico, la CYN posee un carácter citotóxico, mientras que la MC-LR presenta actividad hepatotóxica. En la naturaleza, ambas cianotoxinas pueden encontrarse combinadas, ya que pueden convivir diferentes especies de cianobacterias o una misma especie producir ambas cianotoxinas. Sin embargo, aunque sus efectos por separado son conocidos, los derivados de su mezcla no han sido prácticamente estudiados. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue estudiar las alteraciones morfológicas, tanto a nivel micro como ultraestructural, que CYN y MC-LR, y la combinación de ambas, pudieran producir en la línea celular hepática humana HepG2 tras 24 horas de exposición. Así, la concentración más baja de CYN ensayada (1 µg/mL) no presentó alteraciones morfológicas, mientras que MC-LR (22,5 µg/mL) inducía la presencia de fagosomas. A las concentraciones intermedias (2 µg/mL CYN y 45 µg/mL MC-LR), CYN inducía la presencia de vacuolas fagosómicas y la dilatación del retículo endoplásmico, mientras que MC-LR presentaba rotura de los fagosomas, condensación de la cromatina e indicios de autofagia. Por último, 4 µg/mL CYN produjo una clara desorganización celular e

inicio de autofagia, con inhibición de la división celular, y 90 µg/mL MC-LR indujo muerte celular masiva, con intensa degeneración vacuolar. En combinación, los efectos observados fueron similares, aunque mucho más intensos que de forma individual. Así, a concentraciones bajas, cuando el estrés inducido no es tan dramático, la autofagia representa un mecanismo de supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis, mientras que a concentraciones altas el mecanismo predominante sería la apoptosis. Es por tanto importante considerar los efectos de las mezclas ya que representan escenarios de exposición más reales.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE). Servicio de Biología del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

Palabras clave: Cilindrospermopsina, Microcistina, citotoxicidad, morfología, seguridad alimentaria

SA-P10) EFECTOS DE UN EXTRACTO DE *APHANIZOMENOM OVALISPORUM* SOBRE EL CRECIMIENTO, LA CAPACIDAD FOTOSINTÉTICA Y LA ACUMULACIÓN DE CYN EN *SPINACIA OLERACEA*

Llana-Ruiz-Cabello M[1], *Jos A[1], Cameán AM[1], De Oliveira FL[2], Campos A[2], Vasconcelos V[2]*

[1] Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España. [2] Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR), University of Porto. Portugal

La cilindrospermopsina (CYN) es una cianotoxina producida por multitud de especies de cianobacterias que presenta una distribución muy ubicua y cuya toxicidad está relacionada con la inhibición irreversible de la síntesis de proteínas y glutatión, el daño en el ADN y procesos de estrés oxidativo. Debido a su alta solubilidad, la toxina puede encontrarse en forma libre en las aguas donde crecen las floraciones de las algas productoras, facilitándose así la absorción de la toxina por plantas cultivadas en estas aguas. El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la presencia de la CYN en espinacas cultivadas (*Spinacia oleracea*) en cultivo hidropónico contaminado con un extracto de *Aphanizomenom ovalisporum* productor de esta toxina en concentraciones de 10 y 50 µg/L, así como valorar su influencia en el desarrollo normal de la planta. CYN fue extraída y cuantificada en los tejidos vegetales mediante UHPLC-MS/MS. Los resultados muestran concentraciones de 9,5 ± 6,4 y 36,97 ± 5,2 µg/L de toxina en las plantas expuestas a 10 y 50 µg/L, respectivamente. Así mismo, en relación al desarrollo de la espinaca, los resultados preliminares mostraron que ambas concentraciones comprometen el crecimiento de la misma, disminuyéndolo un 20 % en las plantas expuestas a 10 µg/L y un 50 % en el caso de las expuestas a la concentración superior. Sin embargo, la fotosíntesis no se vio afectada en ningún caso. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de llevar a cabo una completa evaluación de riesgo de esta toxina que debido a su solubilidad es capaz de acumularse en vegetales cultivados.

Agradecimientos: los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Así mismo, María Llana-Ruiz-Cabello quisiera agradecer a la Junta de Andalucía por su beca postdoctoral asociada al proyecto AGR7252.

Palabras clave: cilindrospermopsina, espinaca, hidroponia, presencia, fitotoxicidad

SA-P11) ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE CILINDROSPERMOPSINA EN VEGETALES CRUDOS Y COCINADOS: CARACTERIZACIÓN POR UHPLC-MS/MS ORBITRAP

Guzmán-Guillén R[1], *Maisanaba S[2], Valderrama-Fernández R[3], Font G[4], Meca G[4], Jos A[1], Cameán AM[1]*

[1]Área de Toxicología, Dpto. de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. [2]Área de Toxicología, Dpto. de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Pablo de Olavide, España. [3]Servicio de Espectrometría de Masas, Centro de Investigación Tecnológica e Investigación (CITIUS), Universidad de Sevilla, España. [4]Área de Toxicología, Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España.

El estudio de la exposición humana a Cilindrospermopsina (CYN) a través del consumo de vegetales contaminados con dicha cianotoxina, resulta de gran interés con fines de evaluación del riesgo, ya que debido a su transferencia a través de la cadena alimentaria puede representar problemas de salud pública. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización, mediante UHPLC-MS/MS Orbitrap, de los productos de descomposición de CYN tras un proceso de digestión *in vitro* en lechuga y espinacas crudas, así como espinacas cocinadas, contaminadas con CYN. Para ello, inicialmente se fortificaron las muestras de vegetales con 1 µg CYN/g peso fresco y hirvieron por 2 min (las espinacas cocinadas) o no (los vegetales crudos), antes del proceso de digestión. Además, una solución de CYN pura (20 µg/mL) también se sometió al mismo procedimiento de digestión para comprobar el comportamiento de la toxina sin efecto matriz. Los resultados muestran la presencia de 2 productos de descomposición (C1-A y C1-B), diastereoisómeros del fragmento con *m/z* 292.09617, en la solución de CYN pura (sin cocinar, sin digerir), en lechuga y en espinacas crudas. Las abundancias relativas de C1-A y C1-B se redujeron en la solución de CYN hasta un 11% y 8%, respectivamente, con la digestión salivar comparado con la solución sin digerir. Tras hervir la solución de CYN, las abundancias relativas disminuyeron hasta un 25% y 14% en la fase salivar, y casi fueron imperceptibles en las siguientes fases. En los vegetales sin cocinar, las abundancias relativas descendieron hasta un 16-19%. Ningún fragmento fue detectado en espinacas cocinadas sin digerir, ni en ninguna de las otras fases de digestión de los vegetales. Serían necesarios más estudios sobre la caracterización de la degradación de CYN en estas matrices para una correcta evaluación del riesgo por consumo de vegetales contaminados con CYN.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE).

Palabras clave: Cilindrospermopsina, lechuga, espinacas, productos de degradación, hervido.

SA-P12) EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y MUTAGÉNICA DE CILINDROSPERMOPSINA EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y ESTUDIOS FUTUROS

Diez-Quijada L, Puerto M, Prieto A, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, ***Cameán AM***

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.

Siguiendo las recomendaciones de diferentes organismos internacionales, es necesario la evaluación genotóxica y mutagénica de sustancias presentes en los alimentos, con el fin de garantizar la salud del consumidor. Tal es el caso de la cianotoxina Cilindrospermopsina (CYN). El hombre puede estar en contacto con esta sustancia a través de diferentes vías de exposición, siendo la oral la principal. Diversos estudios han confirmado la capacidad pro-genotóxica de CYN. En el presente trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la capacidad genotóxica y mutagénica de dicha biotoxina mediante diferentes ensayos *in vitro*. Para ello se utilizaron diferentes bases de datos como Science direct o PubMed en las que se usaron como palabras clave *Cylindrospermopsin, genotoxicity, mutagenicity e in vitro.* Está búsqueda estuvo acotada entre los años 2000 y 2017. Para la evaluación de la genotoxidad *in vitro* de CYN, son diferentes los ensayos utilizados, siendo el ensayo cometa el más frecuentemente empleado seguido del ensayo de micronúcleos. Por el contrario, solo en una ocasión se evaluó la mutagenicidad de CYN mediante el test de Ames obteniéndose resultados negativos. La mayoría de los estudios *in vitro* se han realizado en líneas celulares de mamíferos, siendo escasos y contradictorios entre sí los estudios en modelos *in vitro* de peces. No obstante, y a pesar de los diferentes estudios realizados, es necesaria la realización de ensayos

complementarios como el ensayo de linfoma de ratón, así como diferentes estudios de toxicogenómica y proteómica que permitan confirmar la información obtenida hasta la fecha sobre la capacidad genotóxica y/o mutagénica de CYN.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: Genotoxicidad, mutagenicidad, cilindrospermosina, *in vitro*

SA-P13) DETERMINACIÓN DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LECHE MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASA DE ALTA RESOLUCIÓN

Rodríguez-Carrasco Y[1], *Biondi S[2], Gaspari A[2], Graziani G[2], Berrada H[1], Ritieni A[2]*

[1]Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Farmacia, Universitat de València. España. [2]Dipartamento di Farmacia, Università degli studi di Napoli Federico II. Italia.

Los medicamentos veterinarios son ampliamente utilizados con terapéuticos o profilácticos. El uso indebido de éstos y el incumplimiento de los tiempos de espera implica su presencia como residuos en productos de origen animal, como la leche. En particular, la leche es un alimento ampliamente consumido en todo el mundo, tanto por adultos como por niños, por lo que dado los posibles efectos adversos que éstos pueden ocasionar en humanos, el Reglamento 37/2010/CE fija los niveles máximos permitidos en alimentos. En este trabajo, se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de 24 residuos de medicamentos veterinarios en leche mediante cromatografía líquida de ultra alta presión acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS). La extracción y la purificación se basaron en un método QuEChERS modificado. El método desarrollado mostró resultados satisfactorios para los parámetros de validación estudiados: linealidad (R^2> 0.990), exactitud (intervalo 80-105%), precisión (RSD ≤14%) y sensibilidad (LOQ en el intervalo de 0.01-30 pg/mL). El efecto de la matriz se evaluó y se utilizó una recta de calibración en matriz para cuantificar los analitos. El método validado se aplicó a 57 muestras de leche comerciales. Los resultados mostraron la presencia de medicamentos veterinarios en 24 muestras en un intervalo de concentración de 0.007-4.53 ng/mL. Se detectaron hasta siete residuos de medicamentos veterinarios diferentes, siendo el meloxicam el que se encontró con una mayor frecuencia, mientras que la bencilpenicilina se encontró en una muestra a una concentración superior al límite máximo. Finalmente, se consideraron los porcentajes de dosis diarias aceptables considerando el peor escenario posible para adultos y niños. De los valores obtenidos se pone de manifiesto la necesidad de realizar una monitorización continua de los niveles de residuos de medicamentos veterinarios para garantizar la salud de los consumidores.

Agradecimientos: Y. Rodríguez-Carrasco agradece a la Universitat de València el contrato post-doctoral "Atracció de Talent"

Palabras clave: medicamentos veterinarios, leche, QuEChERS, espectrometría de masas

SA-P14) EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN PIENSOS COMERCIALIZADOS EN ITALIA

Rodríguez-Carrasco Y[1], *Izzo L[2], Gaspari A[2], Graziani G[2], Berrada H[1], Ritieni A[2]*

[1]Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Farmacia, Universitat de València. España. [2]Dipartamento di Farmacia, Università degli studi di Napoli Federico II. Italia.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por determinados hongos, y son contaminantes frecuentes de alimentos y piensos. Debido a su importancia en salud pública, se han establecido límites legales en los niveles de concentración de micotoxinas en alimentos y piensos. Los límites máximos de contenido de aflatoxina B1 en piensos están regulados en la Unión Europea por la Directiva 2003/100/EC y además, debido a posteriores investigaciones sobre transferencia de las micotoxinas de piensos a alimentos, se han recomendado unos límites para ocratoxina A, deoxinivalenol, zearalenona, y fumonisinas en piensos (Recomendación 2006/576). El objetivo del estudio fue desarrollar una metodología basada en una extracción tipo QuEChERS acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para la determinación simultánea de 18 micotoxinas (reguladas y no reguladas) en piensos. La metodología propuesta mostró resultados satisfactorios para los parámetros de validación evaluados. Los resultados mostraron que el 100% de los piensos analizados (*n=19*) estaban contaminados por micotoxinas de *Fusarium*: tricotecenos (57.9% con concentraciones entre 8.5 a 183.7 µg/kg), fumonisinas (68.4% con concentraciones entre 12.3 a 618.7 µg/kg), zearalenona (100% con concentraciones entre 0.3 a 24.9 µg/kg) y micotoxinas emergentes (100% con concentracies entre 0.2 a 222.9 µg/kg). No se detectó presencia de aflatoxina B1 en ninguna muestra, única micotoxina con límite máximo fijado en pienso. Pese a la elevada incidencia, las concentraciones halladas fueron inferiores a los valores recomendados (2006/576/EC). No obstante, se detectaron hasta 11 micotoxinas por muestra. El trabajo de investigación realizado permite disponer de una metodología analítica optimizada, transferible y de fácil implementación en laboratorios de control de micotoxinas en piensos.

Agradecimientos: Y. Rodríguez-Carrasco agradece a la Universitat de València el contrato post-doctoral "Atracció de Talent"

Palabras clave: micotoxinas, piensos, QuEChERS, espectrometría de masas

SA-P15) MICROCISTINA-RR COMO INDUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO *IN VITRO*: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Diez-Quijada L, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Llana-Ruiz-Cabello M, Jos A, ***Cameán AM***

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.

Las microcistinas (MC) son cianotoxinas que pueden encontrarse presentes de modo habitual en aguas y alimentos de consumo humano, siendo éstas posibles vías de exposición en el hombre. MC-LR es la cianotoxina más estudiada debido a su gran toxicidad. No obstante, la toxicidad de otros congéneres como MC-RR deben ser tenidos en consideración, siguiendo las recomendaciones de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). En este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica sobre la capacidad de MC-RR de inducir estrés oxidativo (EO) *in vitro*. Para ello, se han utilizado diferentes fuentes bibliográficas como Pubmed o Science Direct usando las siguientes palabras claves *MC-RR, oxidative stress e in vitro*. Dicha búsqueda se realizó entre los años 2000 y 2018. Los resultados indicaron la limitada información existente, siendo escasos los estudios *in vitro* en líneas celulares de origen animal y humano, ya que sólo fueron dos los estudios encontrados. Sin embargo, son varios los estudios que utilizan líneas celulares de origen vegetal para evaluar la inducción de EO por MC-RR, siendo la línea celular BY-2 procedente de la planta de tabaco la más utilizada entre los diferentes autores. Estos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de MC-RR para inducir EO en plantas. En base a la escasez de estudios en líneas celulares humanas y de animales, sería recomendable la realización de más estudios *in vitro*, al encontrarse la MC-RR ampliamente distribuida y por lo tanto ser posible la exposición a la misma.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: Microcistina-RR, estrés oxidativo, *in vitro*

SA-P16) DISTRIBUCIÓN DE MICROCISTINA-RR EN AGUAS CONTINENTALES Y PRESENCIA EN ALIMENTOS

Diez-Quijada L, ***Llana-Ruiz-Cabello M,*** *Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Jos A, Cameán AM*

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.

El interés por el estudio de biotoxinas, como las microcistinas (MC), está relacionado con su capacidad para proliferar en aguas eutrofizadas, estando en contacto con animales y vegetales de consumo humano. La MC-LR ha sido la más estudiada debido a su alta toxicidad; sin embargo, otros congéneres importantes como la MC-RR deben ser tenidos en cuenta. El objetivo del presente trabajo ha sido realizar una revisión exhaustiva sobre la distribución de MC-RR en aguas continentales. Además, se ha estudiado la presencia de esta toxina en alimentos de consumo habitual (pescado, moluscos o vegetales) por ser la dieta una vía de exposición importante para el ser humano. Para ello se han empleado diversas bases de datos como PubMed, ScienceDirect o Google Académico utilizando palabras clave como *MC-RR, distribution, presence, water*, o *food*. Con objeto de destacar los trabajos más recientes, la búsqueda quedó acotada entre los años 2010 y 2018. Los resultados han mostrado que la MC-RR presenta una distribución ubicua con floraciones en todos los continentes, siendo África el país con menos incidencias descritas y Asia aquél donde más estudios se han llevado a cabo. Muchos autores coinciden en que el aumento de eutrofización de las aguas contribuye a dicha proliferación. Por otro lado, debido a su capacidad de bioacumulación, se ha encontrado MC-RR en tejidos tanto vegetales como animales. Sin embargo, aunque se observa un interés creciente en este aspecto, en muchos casos las técnicas analíticas empleadas no permiten determinar el congénere específico (en este caso RR) que contamina el alimento. Por todo esto, las MC en general y la MC-RR en particular, pueden constituir un riesgo para la salud humana, siendo objeto de interés y preocupación para la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: microcistina, agua, alimentos, distribución, presencia

SA-P17) CREACIÓN DE LA "RED NACIONAL SOBRE LAS MICOTOXINAS Y HONGOS TOXIGÉNICOS Y DE SUS PROCESOS DE DESCONTAMINACIÓN"

Fernández-Franzón M, *Juan-García A, Ferrer E, Berrada H, Ruiz MJ, Font G*

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de València.

La Red de Excelencia sobre hongos toxigénicos y micotoxinas reúne a los diez grupos activos mas importantes de España que estudian las micotoxinas y los hongos toxigénicos. Desde que se constituyó la Red, se han realizado numerosas actividades como reuniones periódicas que han permitido el intercambio de conocimientos y colaboraciones sobre los estudios que se estan realizando entre los integrantes de la Red y la industria o la difusión de información a traves de los medios de comunicación. El Preliminary annual report 2015 del Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) que categoriza las alertas alimentarias, sitúa la micotoxinas en segundo lugar, tras los microorganismos patógenos, y por primera vez en un puesto superior a los plaguicidas, lo que pone de manifiesto la vigencia y el interés de la temática a nivel internacional. Desde la Red se ha resaltado la necesidad de desarrollar herramientas robustas que permitan conocer la exposición de los consumidores a las micotoxinas y asi realizar una mayor aproximación al riesgo real. Además de conocer los niveles de micotoxinas en los principales alimentos de nuestra dieta se deben complementar con estudios sobre la presencia de micotoxinas/biomarcadores en los fluidos como orina y sangre, asi como estudios de hábitos de consumo. Por otro lado, la Red ha manifestado la necesidad de coordinar y desarrollar nuevas estrategias y actuaciones que fomenten la mitigación de la presencia de micotoxinas y hongos toxigénicos presentes en los alimentos. Otro de los aspectos más importantes son las medidas que se deberían recomendar para que la industria alimentaria pueda disminuir el crecimiento fúngico en los alimentos que presentan diferente grado de humedad y que requieran conservación.

Palabras Clave: Red de Excelencia, micotoxinas, hongos toxigénicos, mitigación, biomarcadores

Agradecimientos: La Red nacional sobre las micotoxinas y hongos toxigénicos y de sus procesos de descontaminación AGL2017-90787-REDT ha sido financiada por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

SA-P18) LA CILINDROSPERMOPSINA INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO *IN VITRO*: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y PROPUESTAS DE FUTURO

Diez-Quijada L, Pichardo S, Cameán AM, ***Jos A***

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.

La Cilindrospermopsina (CYN) es una cianotoxina que ha sido ampliamente estudiada por su toxicidad así como por su amplia distribución. CYN puede estar en contacto con el ser humano a través de distintas vías de exposición (oral, inhalatoria o dérmica). Uno de los mecanismos de toxicidad de CYN es la inducción de estrés oxidativo. El objetivo del presente trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica sobre la capacidad de CYN para producir estrés oxidativo en modelos experimentales *in vitro*. Dicha búsqueda fue limitada desde los años 90 hasta la actualidad. Para ello se han utilizado diferentes bases de datos científicas como ScienceDirect o PubMed, usando palabras clave como *Cylindrospermopsin, oxidative stress* e *in vitro*. El análisis de la bibliografía revela que son diversos los marcadores bioquímicos evaluados (peroxidación lipídica, antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasa, etc. y no enzimáticos). De entre todos ellos, el Glutatión fue el más estudiado al ser uno de los principales antioxidantes del organismo y dado que es conocido que la CYN inhibe su síntesis. Además, los resultados obtenidos difieren entre los distintos autores, lo que puede deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas (modelos experimentales, concentraciones y tiempos de exposición). Sin embargo, todos los resultados obtenidos coinciden en la capacidad de CYN para producir estrés oxidativo a través de la formación de especies reactivas de oxígeno. No obstante, también se identifican ciertas lagunas, como la escasez de estudios en modelos *in vitro* de peces, de biomarcadores como la oxidación de proteínas o ADN, o la influencia en los resultados de otras sustancias distintas a CYN que pueden estar presentes en los extractos.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: Cilindrospermopsina, estrés oxidativo, *in vitro*

SA-P19) EVALUACIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS AL PLOMO POR EL CONSUMO DE CARNE DE CAZA DE ESPECIES DE AVES ACUÁTICAS

Navas I, Gluszko O, ***García-Fernández AJ***

Laboratorio de Toxicología, Dpto. Ciencias Sociosanitarias, Instituto de Investigación Biosanitaria de Murcia (IMIB-Arrixaca-UM), Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

En este trabajo se ha llevado a cabo una evaluación de la exposición y el riesgo de aparición de efectos adversos por consumo de carne de caza de especies de aves cinegéticas que habitan humedales. Entre los efectos adversos que produce el plomo se han descrito los neurotóxicos en fetos y niños, así como efectos cardiovasculares y renales en adultos. Para determinar el riesgo que supone la ingesta de las aves que ingieren perdigones de plomo en humedales, hemos

llevado a cabo este estudio, a partir del contenido en plomo detectado en músculo de ánades reales (Anas platyrhynchos), que previamente habían sido tratados con perdigones de plomo, por vía oral. El análisis de plomo se realizó mediante voltamperometría de redisolución anódica, previa digestión húmeda de las muestras. Las concentraciones de plomo en el músculo fueron directamente proporcionales a los perdigones de plomo administrados. A partir de los datos de plomo muscular, estimando la ingesta diaria de carne de caza de aves, calculamos la exposición a plomo por consumo de este tipo de alimento. A este valor le añadimos la ingesta dietética estimada de plomo (excluyendo la carne de caza). Posteriormente se calculó el margen de exposición, dividiendo el BMDL (límite de confianza más bajo) para cada efecto, convertido en valor de ingesta, entre la ingesta diaria estimada en nuestro procedimiento experimental. Según nuestro estudio el grupo de mayor riesgo para los efectos cardiovasculares y renales, sería el de los consumidores extremos de carne de caza; mientras que para los efectos neurotóxicos lo serían, mayormente, los pertenecientes a los consumidores extremos, pero también el grupo de la media alta de los consumidores medios de la carne de caza de aves.

Agradecimientos: Proyecto MASCA

Palabras clave: Carne de caza, plomo, evaluación del riesgo, ánade real, *Anas platyrynchos.*

SA-P20) EVALUACIÓN DE LA POTENCIAL MUTAGENICIDAD DE CILINDROSPERMOPSINA Y SUS METABOLITOS MEDIANTE EL ENSAYO DE LINFOMA DE RATÓN

*Puerto M[1], **Mellado-García P[1]**, Maisanaba M[2], Jos Á[1], Cameán AM[1]*

[1] Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.[2]Área de Toxicología, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.

Cilindrospermopsina (CYN) es una cianotoxina emergente producida por diferentes especies de cianobacterias caracterizada por ser una molécula muy hidrosoluble y estable a alta intensidad de luz, pH y temperatura. Principalmente, se encuentra en su forma extracelular que, junto a las anteriores propiedades mencionadas, hacen de la vía oral, a través del consumo de alimentos y aguas contaminadas, la principal vía de exposición humana. Desde el punto de vista de acción tóxica, CYN inhibe la síntesis de proteínas, interviene en el daño y estrés oxidativo, así como en la apoptosis y en alteraciones histopatológicas. Sin embargo, la implicación de CYN y de sus metabolitos en desarrollar efectos mutagénicos no está esclarecida por el momento. Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) propone la necesidad de caracterizar aún más el perfil toxicológico de esta cianotoxina y, en este sentido, la mutagenicidad es un punto clave. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar la posible capacidad de CYN y sus metabolitos en producir una mutación en el gen timidina quinasa, mediante el empleo del ensayo de linfoma de ratón (MLA) en células L5178YTk $^{+/-}$. Los resultados mostraron que CYN (0-0,675 µg/mL) en ausencia y presencia de la fracción microsómica S9 no produce respuesta mutagénica tras 4 h de exposición, así como tampoco se obtuvo daño significativo tras 24h en ausencia de S9. Sin embargo, los controles positivos realizados en paralelo con metilmetanosulfonato (10 µg/ml), mostraron un aumento significativo de la frecuencia de mutación en comparación con el grupo control. En vista a los datos obtenidos podemos concluir que tanto CYN como sus metabolitos no son capaces de producir alteración significativa del gen timidina quinasa en células L5178YTk $^{+/-}$, siendo necesario la realización de una batería de ensayos *in vitro* para una completa evaluación de su potencial genotoxicidad.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE)

Palabras clave: Cilindrospermopsina, mutagenicidad, ensayo de linfoma de ratón, células L5178YTk +/-

TOXICOLOGÍA FORENSE

Comunicaciones orales

***Moderadora:** Dra. Ana Mª Bermejo Barrera.*

TF-O1) POSIBILIDADES DEL HUESO EN ANÁLISIS TOXICOLÓGICO FORENSE

***Morillas ML[1],** Sepulveda JA[2], Simão L[3], Font G[1], Morillas D[4], Morillas A[5]*

[1]Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cataluña. [2]CIME-Centro Integral de Medicina. [3]Centro de Salud San Miguel. [4] Brains International School. [5]mf-Arquitectura.

Cuando nos enfrentamos a una muerte y la determinación de su causa, la toxicología juega un papel muy importante. Pero en determinadas situaciones existe un acceso limitado a muestras en las que detectar consumo de sustancias y su relevancia en el momento de la muerte. Así, en los últimos años se vienen estudiando otras posibles matrices y entre ellas, el hueso, que se estima puede ser útil para estudios toxicológicos hasta 5 años. En este trabajo hemos revisado los textos localizados en la base de datos Pubmed en los que aparece el hueso y/o médula ósea (MO) en análisis toxicológico forense. Así, hemos encontrado que no se han propuesto procedimientos estandarizados de obtención de la muestra de MO, ni tampoco en relación con su almacenamiento. También existen diversos procedimientos para su preparación. En relación con las técnicas de análisis varias han resultado adecuadas, siendo la separación cromatográfica la más utilizada. Dado que cualquier sustancia que circula en sangre puede estar en MO, se asume que los xenobióticos pueden ser detectados en ésta. Aunque no existen datos concretos que demuestren que los niveles de sustancias encontrados en MO sean representativos de los de sangre en el momento de la muerte. Se debe tener en cuenta que la distribución post mortem de una droga parece no ser uniforme así como otras circunstancias que pueden influir en las concentraciones halladas en MO, como el sitio de obtención, la edad, ecuación agua/grasa de la MO, propiedades físico-químicas de la molécula y la estabilidad de la MO en el intervalo post mortem. A pesar de que la interpretación de los resultados puede ser difícil por falta de datos bibliográficos, consideramos que tanto el hueso como la MO tienen un gran potencial como matriz para análisis en toxicología forense. Aun así, son necesarios más estudios.

Palabras clave: hueso, médula ósea, análisis, toxicología

TF-O2) ESTUDIO DE METABOLITOS DEL ETANOL EN CASOS FORENSES DEL INSTITUTO ANATÓMICO FORENSE DE MADRID

***López–Matayoshi C[1],** Andreu Tena E[2,3], Perea Ayuso MJ, Zapater Rodríguez G[3], Sánchez Diez I[3], Segura Abad L[2], Arroyo–Pardo E[1].*

[1]Grupo de Investigación en Ciencias Forenses: genética y toxicología del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Anatomía Patológica. Universidad Complutense de Madrid. [2]Cuerpo Nacional de Médicos Forenses con destino en la Comunidad de Madrid. [3]Instituto Anatómico Forense de Madrid. Consejería de Presidencia, Justicia y Portavocía del Gobierno. Comunidad de Madrid.

El etanol es considerado una droga legal con gran repercusión socio–económica y su consumo se analiza en el derecho, medicina, psicología, etc. Su consumo influye en el tipo de bebedor: social, abusivo/excesivo, crónico o dependiente, el cual se relaciona con la cantidad de etanol ingerido, que determina a su vez el consumo agudo o crónico y, finalmente, puede modificar su metabolismo. El organismo humano elimina etanol por diferentes vías, pero si el alcohol está en exceso las vías se alteran y las concentraciones de metabolitos se modifican. En este trabajo se comparan 8 casos forenses, con diferentes características médico legales. Las correspondientes autopsias judiciales se realizaron en el Instituto Anatómico Forense de Madrid (IAF–Madrid) y sus muestras biológicas fueron analizadas para diagnosticar el consumo de alcohol de cada individuo. Se estudian antecedentes clínicos, sociales, psicológicos o forenses, relacionados con el consumo de alcohol y

recogidos durante la investigación de cada caso judicial. El estudio incluye los resultados de ensayos químicos–toxicológicos en sangre, orina y pelo desarrollados en el laboratorio de toxicología y bioquímica del IAF–Madrid. Estos análisis reflejan las concentraciones de etanol, acetaldehído y etilglucurónido en las respectivas muestras forenses. La comparación de datos y resultados permite inferir que una alcoholemia negativa no demuestra la falta de consumo de alcohol, mientras que la presencia de metabolitos de etanol si lo confirma. Estudiando la relación entre etanol y sus metabolitos se puede inferir el tipo de consumo y, cuando se relacionan las concentraciones con el tipo de muestra, se puede identificar a un tipo de bebedor.

Agradecimientos: Los autores agradecen al personal del Departamento de Trabajo Social y al personal del Departamento de Psicología, del Instituto Anatómico Forense de Madrid, por colaborar con datos y resolviendo dudas para este trabajo.

Palabras Claves: etanol, acetaldehido, etilglucurónido, hepatopatía, toxicología

Comunicaciones tipo póster

TF-P1) REVISIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN CASOS DE ENVENENAMIENTO CON RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES

Valverde I, *Espín S, García-Fernández AJ*

Área de Toxicología, Departamento de Ciencias Sociosanitarias, IMIB-Arrixaca, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia.

Los rodenticidas anticoagulantes son empleados comúnmente tanto a nivel doméstico como en agricultura y ganadería. El problema surge cuando estos venenos son ingeridos por animales considerados no diana, causando graves intoxicaciones. El objetivo de este trabajo es recopilar los diferentes métodos analíticos empleados para la detección dichos rodenticidas en muestras de origen animal y humano, que ayudará a desarrollar y optimizar nuevas técnicas aplicables a casos de envenenamientos. Para ello se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de las publicaciones en las que se han analizado rodenticidas anticoagulantes en muestras biológicas (sangre, hígado, plasma, suero, pelo, y otros tejidos) en los años comprendidos entre 1995 y 2018. En total se han revisado 34 artículos. Las técnicas publicadas están descritas para el análisis de bromadiolona (73,81%), brodifacum (66,67%), warfarina (57,14%), difenacum (50,00%) y clorofacinona (45,24%), principalmente. Las muestras más frecuentemente analizadas son sangre (35,71%) e hígado (33,33%), seguidas de plasma (11,90%) y suero (9,52%). La cantidad de muestra empleada para el análisis está comprendida entre 0,02 y 5 g en muestras sólidas y entre 0,1 y 5 ml en muestras líquidas. Las técnicas de extracción más usadas son líquido-líquido y extracción en fase sólida (28,57% cada uno). Como solvente extractante, el 47,62% de las técnicas usa acetonitrilo, y el 28,57% usa metanol.En la fase de purificación, los compuestos más usados son alúmina (14,29%), sulfato de magnesio, amina primaria secundaria (PSA), C18 y metanol (9,52% cada uno). La técnica analítica más empleada es la cromatografía líquida unida a cromatografía de masas (68,29%). Los porcentajes de recuperación son 18-134%, los límites de detección (LD) son 0.0003-1700 ng/ml, 0.001-25000 ng/g y los de cuantificación (LQ) 0.0006-150000 ng/ml, 0.005-301.5 ng/g, según la sustancia química y adaptación del método empleada. Dada la diversidad de métodos empleados y la variabilidad de recuperaciones y LD/LQ observados, es necesaria una optimización de las técnicas analíticas para su aplicación en diferentes matrices y para la detección eficiente de diferentes rodenticidas involucrados en casos de envenenamiento.

Agradecimientos: Fundación Séneca (Proyecto MASCA'2014 - 19481/PI/14 y Saavedra Fajardo - 20031/SF/16).

Palabras clave: rodenticidas anticoagulantes, envenenamiento, cebo, bromadiolona, LC-MS.

TF-P2) INGESTA DE AMINOFENAZONA COMO MECANISMO SUICIDA.

Martínez I[1], *De la Higuera J[2]*

[1] Sección de Anatomía Forense e Histopatología. [2] Servicio de Laboratorio Forense. IMLyCF de Granada.

Se trata de un varón de 64 años de edad encontrado fallecido en su domicilio, en el suelo del pasillo, donde se encuentran varias cajas vacías de Lorazepam y Lexatín en proximidad al mismo. Deja nota manuscrita de suicidio. Practicada la autopsia, en los datos macroscópicos, destaca la presencia de congestión generalizada, edema agudo de pulmón y cardiopatía aterosclerotica crónica. El análisis toxicológico muestra los siguientes datos: Sangre, presencia de Aminofenazona, Lorazepam, Diazepam e Ibuprofeno. Orina: Aminofenazona, Ibuprofeno, Lorazepam y metabolitos del Diazepam. Contenido gástricoLorazepam, Diazepam y elevada concentración de Aminofenazona. La causa fundamental de la muerte fue la ingestión medicamentosa de etiología suicida. La Aminofenazona es un analgésico, antipirético y antiinflamatorio del grupo de las Pirazolonas, se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal, teniendo una vida media en sangre de una a cuatro horas y se excreta por vía renal. En la actualidad no se encuentra comercializado en nuestro país ningún medicamento que contenga como principio activo la Aminofenazona, por la posibilidad de inducir agranulocitosis letal y haber, por tanto, sido retirada su comercialización. Se ha realizado una búsqueda en Internet, para poder contemplar de dónde ha podido ser obtenido y se han encontrado abundantes páginas de venta libre de dicha sustancia. Llamamos la atención al uso indiscriminado de productos farmacéuticos sin el adecuado control sanitario a través de la venta libre en Internet con los evidentes riesgos para la salud y el más que posible incremento de la potenciación y reacciones adversas al uso concomitante con otros fármacos, todos ellos psicoactivos, de uso legal.

Palabras claves: aminofenazona, suicidio, internet, pirazolonas

TF-P3) MUERTE POR CONSUMO ABUSIVO DE ETANOL. ESTUDIO COMPARADO DE DOS CASOS.

López–Matayoshi C[1], *Tortosa Laso C[2], Andreu Tena E[2,3], Fernández Aceñero MJ[4], Romero B[5], Muñoz E[5], Carricondo F[5], Segura Abad L[2], Arroyo–Pardo E[1]*

[1] Grupo de Investigación en Ciencias Forenses: genética y toxicología del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Anatomía Patológica. Universidad Complutense de Madrid. [2] Cuerpo Nacional de Médicos Forenses con destino en la Comunidad de Madrid. [3] Instituto Anatómico Forense de Madrid. Consejería de Presidencia, Justicia y Portavocía del Gobierno. Comunidad de Madrid. [4] Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. [5] Grupo de Neurobiología de la Audición del Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología, de Universidad Complutense de Madrid

El consumo abusivo de etanol es la ingesta excesiva de bebidas alcohólicas y, en la actualidad, se relaciona con el riesgo social, familiar, clínico, psico–patológico o con la seguridad vial. La Organización Mundial de la Salud lo identificó como un objetivo para la Salud Pública, por las múltiples consecuencias identificadas: generador de enfermedades, violencia, lesiones o muertes. En el presente trabajo se estudian y comparan dos casos, diferentes entre sí por los antecedentes previos a la muerte, pero semejantes porque el consumo abusivo de etanol se relaciona con la causa fundamental de la muerte. El primero, caso clínico al inicio, describe a una persona monitorizada en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid y que, tras fallecer, se traslada al Instituto Anatómico Forense de Madrid (IAF-Madrid), para practicar la autopsia judicial. El segundo caso, una presunta muerte violenta, que se descarta después de la investigación forense desarrollada en el IAF-Madrid. El estudio comparativo incluye anamnesis, resultados clínicos, ensayos químico–toxicológicos y diagnósticos patológicos. En las diferentes muestras forenses se analizaron las concentraciones de etanol y de sus metabolitos, además de confirmar la hepatopatía producida por el exceso de etanol. La comparación de datos y resultados permite describir la estrecha relación entre el consumo abusivo de alcohol y,

los cambios fisiopatológicos y psíquicos producidos en el organismo. Se propone que esta relación pueda ser utilizada por la Toxicología Forense para diseñar información preventiva, frente a delitos por la ingesta excesiva de bebidas alcohólicas; también se propone la utilidad del resultado forense como herramienta para el diagnóstico clínico de ciertas patologías producidas por el exceso de etanol.

Agradecimientos: Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Toxicología y Bioquímica del Instituto Anatómico Forense, por su colaboración durante el desarrollo de los análisis químicos – toxicológicos.

Palabras Claves: alcohol, metabolitos, etilglucurónido, hepatopatía, toxicología

TF-P4) SUICIDIO POR INGESTIÓN DE AZIDA SÓDICA

Martínez I[1], *De La Higuera J[2]*

[1] Sección de Anatomía Forense e Histopatología. [2] Servicio Laboratorio Forense, IMLyCF de Granada.

Las azidas tienen diversos usos en la industria de productos químicos, colorantes, plásticos, caucho y metales. La azida sódica o Aziduro de sodio, con fórmula química NaN_3 y Nº CAS 26628-22-8, se utiliza en los laboratorios de microbiología para la preparación de Sangre Agar Base Con Azida, medio adecuado para el aislamiento de estreptococos y estafilococos de diversos materiales, debido a que inhibe los microorganismos Gram negativos. Su estado físico es de cristales incoloros de forma hexagonal e inodoros. La DL50 oral se estima en 27 mg/kg en rata y la DL50 dérmica en 20 mg/kg en conejos. Información de seguridad según el GHS de envasado y etiquetado con pictogramas de peligro y muy tóxico para organismos acuáticos. Se puede absorber por inhalación causando edema pulmonar; por contacto; o por ingestión (H300 tóxico mortal) con afectación del sistema nervioso causando temblores, convulsiones y muerte. Se presenta el caso de un varón de 30 años, becario universitario en Departamento de Microbiología con antecedentes personales de depresión. Es encontrado fallecido en un almacén junto a una botella de agua, un bote vacío con etiqueta "X-Azida sódica" y un blíster vacío de Alprazolam (fármaco ansiolítico y antidepresivo). En la realización de la autopsia destacan un intenso edema de pulmón y hemorragias pulmonares, ambos confirmados por estudio histopatológico. En el estudio toxicológico se encuentran dosis tóxicas de azida sódica (30.42 mg/L) y trazas de alprazolam, con presencia de estas mismas sustancias en contenido gástrico. En el bote se detecta la presencia de azida sódica. En este caso se comprueba su alta toxicidad con muy rápida absorción, distribución y efectos y la producción de daño pulmonar no solo por inhalación sino también por ingestión.

Palabras claves: azida, Azium, suicidio, ingestión

TOXICOLOGÍA CLÍNICA

Comunicaciones orales

Moderadora: *Dra. Ana Isabel Morales Martín.*

TC-O1) REINGRESOS HOSPITALARIOS POR INTOXICACIÓN AGUDA EN UN HOSPITAL TERCIARIO ESPAÑOL: ANÁLISIS TEMPORAL MEDIANTE UN PROGRAMA DE TOXICOVIGILANCIA ACTIVA.

Muñoz R[1], *Cobo J[1,2], Carballo C[1,2], Borobia A M[1,3], Carcas AJ[1,3].*

[1] Unidad de Toxicología Clínica (UTC), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, España. [2] S. de Urgencias Hospital General, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, España. Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, IdiPaz. [3] S. Farmacología Clínica, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, España. Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, IdiPaz.

El Hospital Universitario La Paz (HULP) puso en marcha en diciembre de 2010 la primera Unidad de Toxicología Clínica (UTC) de la Comunidad de Madrid, contando con un sistema de toxicovigilancia activa de detección semiautomatizada de casos de intoxicación aguda (IA) a partir de los informes clínicos informatizados (SAT-HULP) de los pacientes atendidos en el Servicio de Urgencias del Hospital General (SUH). Sabemos que el análisis del patrón del reingreso precoz (RP) en un hospital adquiere una importancia relevante para identificar comportamiento de dicha variable de calidad asistencial. Se estableció un control de calidad para los RP mensuales en el SUH, empleándose los casos de IA detectados por el SAT-HULP con RP (< 1 mes) entre abril de 2011 y marzo de 2016 para conformar la serie temporal del número de RP mensuales. Se recopiló una muestra de 5.798 casos de IA atendidas en el SUH para dicho período. El número de reingresos precoces por mes fluctuó entre 9 y 38 en el total de la serie. Para poder realizar una predicción a corto plazo se empleó una metodología autoproyectiva determinista, aplicando un modelo lineal de Holt con el fin de obtener la línea de suavizado libre de variaciones estacionales y óptima para la predicción. Finalmente se realizó un análisis de tendencia para poder predecir un comportamiento a largo plazo. La aplicación del modelo produjo un pronóstico de comportamiento del número de reingresos precoces para abril de 2016 – marzo de 2017 que contrastado con lo observado en ese año nos permitió considerarlo adecuado. El contraste del canal de control de calidad estadística de los RP en el SUH con esta técnica permite considerar a este instrumento como adecuado y fiable para monitorizar dicha variable de resultado en el proceso de atención al paciente intoxicado con vistas a una intervención oportuna.

Palabras clave: intoxicación aguda, serie temporal, modelo lineal de Holt, control de calidad.

TC-O2) CONSECUENCIAS SOBRE LA SALUD DE MUJERES EN EDAD FÉRTIL TRAS LA EXPOSICIÓN LABORAL A PLAGUICIDAS

Dahiri B[1], *Martin-Reina J[1], Fernández I[2], Roldán ME[2], Ortega VM[2], Vázquez I[2], Fernández-Palacín A, Bautista JD[3], Moreno I[1]*

[1] Área de Toxicología, Universidad de Sevilla, España. [2] Área Sanitaria de Osuna. [3] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, España

Los plaguicidas son sustancias que previenen, destruyen o controlan plagas. A estos compuestos están expuestos trabajadores de distintos sectores agrícolas, principalmente aquellos encargados de aplicarlos. El objetivo principal de este estudio fue determinar el grado de exposición a plaguicidas y metales en una muestra poblacional de mujeres trabajadoras en la recolección de frutas y verduras frente a trabajadoras de la fábrica de elaboración de conservas. Se ha llevado a cabo a distintos tiempos de exposición, identificando posibles factores asociados a dicha exposición y las posibles consecuencias sobre su salud. Para ello y tras firma del consentimiento informado se les recogió información mediante encuestas epidemiológicas para realizar una valoración del estado general de salud. Además se tomaron distintas muestras de sangre destinadas a: 1 estudio de la bioquímica sérica. 2. Estudio de los niveles de peroxidación lipídica como marcador de estrés oxidativo. 3. Análisis de la actividad acetilcolinesterasa eritrocitaria como marcador de exposición a organofosforados y 4. Análisis de niveles de metales en sangre. Se observó una diferencia significativa en los niveles de peroxidación lipídica en suero entre las mujeres trabajadoras del campo y las de la fábrica, en los dos períodos de muestreo. La actividad de la acetilcolinesterasa eritrocitaria no presentó diferencias significativas entre ambos grupos de mujeres (trabajadoras vs no trabajadoras), sin embargo, sí que se observó diferencia entre el grupo de trabajadoras a los dos períodos de muestreo. Finalmente, de los metales estudiados sólo se detectaron Al, Mn, Cu, Zn y Pb, existiendo diferencias significativas en ambos grupos en los niveles de Al, Mn y Pb. Estos resultados forman parte de un estudio a largo plazo, por lo que las conclusiones serán preliminares hasta la finalización del estudio. De momento se confirma la relación entre la exposición laboral a plaguicidas y la alteración de la mayoría de los parámetros estudiados.

Palabras clave: plaguicidas, lipoperoxidación, metales, acetilcolinesterasa, mujeres

Comunicaciones tipo póster

TC-P1) ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS TRANSAMINASAS HEPÁTICAS Y COLINESTERASA PLASMÁTICA EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS DE LA SIERRA SUR DE SEVILLA

Martin-Reina J [1]**,** *T. López*[2]*, Moreno I*[1]*, J.D. Bautista Palomas*[3]*,*
[1] *Área de Toxicología, Facultad de Farmacia. Sevilla* [2]*Instituto Técnico De Prevención ITP* [3] *Área de Bioquímica, Facultad de Farmacia. Sevilla.*

Los biocidas son productos químicos que se emplean en la agricultura con el fin de evitar plagas indeseables que puedan alterar los cultivos. La legislación española en materia de prevención de riesgos laborales indica que a los trabajadores hay que llevarles a cabo una vigilancia de su salud. Ésta se lleva a cabo mediante reconocimientos médicos que se realizan bajo unos protocolos editados por el Ministerio de Sanidad. Un protocolo de aplicación a trabajadores que están expuestos a plaguicidas, basa su control biológico en la determinación de la colinesterasa plasmática, eritrocitaria, y las transaminasas GPT y GGT. Como en el resto del país, también en la sierra sur de Sevilla es habitual el uso de biocidas. Por ello se llevó a cabo este estudio con el fin de comprobar si los trabajadores relacionados con los biocidas tenían alteradas las enzimas hepáticas que, según el protocolo de Vigilancia de la Salud, hay que vigilar: GOT; GPT, GGT y alterada la actividad de las colinesterasas. Se analizaron muestras de 71 trabajadores, todos hombres, a lo largo de los años: 2015, 2016 y 2017, obteniéndose tras este estudio las siguientes conclusiones: El 50% de los trabajadores analizados durante el año 2016 tenia, al menos una enzima alterada. Durante el año 2017, de los 33 trabajadores analizados, ninguno presentaba valores elevados de colinesterasa y casi el 80% no presentaba enzimas alteradas. Del total de los trabajadores analizados a lo largo de los tres años, el 32% tiene, al menos una enzima alterada. Por todo ello, se podría concluir: En primer lugar, se echa en falta la determinación de la actividad de la colinesterasa eritrocitaria, como elemento biológico importante en la valoración para determinar si un trabajador está afectado por plaguicidas. En segundo lugar, si bien la tendencia en los resultados analíticos es positiva a lo largo de estos meses evaluados, el que haya transaminasas hepáticas alteradas y no tengamos los resultados de la Colinesterasa eritrocitaria, no debería hacernos garantizar que los trabajadores no están afectados por su exposición a plaguicidas.

Palabras clave: Plaguicidas, Colinesterasa, Transaminasas, Prevención, Trabajadores

TC-P2) INGESTIÓN DE CUERPOS EXTRAÑOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS, ATENDIDOS POR EL CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE.

Silva L.[1]*, Olivares-Trigo P.*[1]*, Cerda P.*[1]*,* ***Medel-Jara P.***[1,3]***,*** *Iturra P*[1]*, Ríos JC*[1,2]*.*
[1] *Centro de Información Toxicológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.* [2] *Departamento de Laboratorios Clínicos, Pontificia Universidad Católica de Chile.* [3] *Departamento de Salud del Adulto y Senescente, Escuela de Enfermería, Pontificia Universidad Católica de Chile.*

La ingestión de cuerpos extraños es un motivo de consulta habitual en la urgencia pediátrica, la cual puede progresar asintomáticamente o presentar serias complicaciones. El objetivo del estudio fue caracterizar la totalidad de consultas por ingestión de cuerpos extraños atendidos por el Centro de Información Toxicologica de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC) en menores de 12 años, a través de un estudio descriptivo-analítico de las consultas atendidas por CITUC entre Enero del año 2006 y Diciembre 2015. Durante el período analizado, se recibieron 1.951 llamados relacionados a casos de ingestión de cuerpos extraños en la población objetivo. La edad promedio de los casos incluídos fue 3,8 años. El grupo etario 2-5 años representa el 54,5% de los casos. En cuanto al sexo, el 54,5% correspondió a individuos de sexo masculino. En relación a la circunstancia de exposición, el 100% de las exposiciones fueron accidentales. El 97,9% de los casos se produjo en el hogar. Los llamados se realizaron principalmente desde el hogar (66,5%), seguido por hospitales (22,1%). Quienes se contactaron con el Centro fueron mayoritariamente familiares (65,4%), seguidos por médicos (30,3%). El agente mas prevalente en los casos fueron las pilas/baterías (27,9%), siendo el grupo etario 2-5 años el que presenta el mayor riesgo de ingerir este tipo de objetos. La ingestión de crecencios resultó ser la segunda causa de reporte de ingestión de cuerpos extraño, siendo el grupo etario de 6-12 años el que presentó un riesgo 3,2 veces mayor de ingestión en comparación los otros grupos etarios incluidos en el estudio. Esta última observación es interesante en el sentido de que en menores de 12 años el agente involucrado en los casos por ingesta de cuerpo extraño varía dependiendo del tramo etario en el que están.

Palabras clave: Toxicología, Toxicología Clínica, Pediatría, Cuerpo Extraño.

TC-P3) PRINCIPALES HALLAZGOS EN LA INTOXICACIÓN POR METANOL

Morillas ML[1]***,*** *Simão L*[2]*, Font G*[1]*, Sepulveda JA*[3]*, Morillas D*[4]*, Morillas A*[5]
[1]*Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cataluña.* [2]*Centro de Salud San Miguel.* [3]*CIME-Centro Integral de Medicina.* [4] *Brains International School.* [5]*mf-Arquitectura.*

El metanol o alcohol de madera es un líquido, incoloro, volátil y con olor frutal característico. Está presente en numerosos productos que afectan a nuestra vida diaria. Aunque no es una intoxicación habitual en nuestro medio, es importante ya que conlleva una alta morbi-mortalidad. Dada la gravedad, requiere un tratamiento precoz en un medio asistencial adecuado. La intoxicación se produce generalmente por ingesta accidental o intencionada. En este trabajo describimos los hallazgos más característicos en este tipo de intoxicación y hemos revisado la bibliografía en la base de datos Pubmed en relación a ella. El diagnóstico de sospecha se realiza por los antecedentes (ingestión) y la clínica. La analítica confirma el diagnóstico, siendo la acidosis metabólica el hallazgo más característico con anión gap y osmolar aumentado. Se deben determinar los niveles de metanol en plasma y también los de etanol, ya que la coingesta mejora el pronóstico. Los síntomas y signos de la intoxicación por vía oral generalmente afectan al sistema nervioso central, tracto gastrointestinal y ojos. Aunque también pueden repercutir en otros sistemas como aparato cardio-circulatorio, vías respiratorias, piel y uñas. El hallazgo radiológico más característico es la necrosis bilateral de los putámenes, que en algunos casos puede ser hemorrágica, aunque las pruebas al inicio pueden ser normales. Sin una historia clínica de ingestión de metanol, el diagnóstico diferencial es amplio. Una vez diagnosticada la intoxicación y puesto el tratamiento, es importante establecer si la misma ha sido accidental, suicida u homicida. Es necesaria la realización de autopsia en caso de desenlace fatal.

Palabras clave: metanol, intoxicación, análisis, toxicología

TC-P4) SILICIO COMO PROTECTOR DEL DAÑO PANCREÁTICO EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 INDUCIDO CON STZ-NAD

Macho-González A[1]***,*** *Garcimartín A*[2]*, Naes F*[1]*, López-Oliva ME*[3]*, González-Muñoz MJ*[4]*, Bastida S*[1]*, Sánchez-Muniz FJ*[1]*, Benedí J*[2]
[1] *Dpto de Nutrición y Ciencia de los Alimentos (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.* [2] *Dpto de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.* [3] *Sección departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.* [4] *Dpto. Ciencias Biomédicas. Unidad Docente de Toxicología. Universidad de Alcalá, España.*

Entre los modelos más aceptados de inducción de Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) encontramos la administración de estreptozotocina. Dicho compuesto presenta efecto citotóxico sobre las células β pancreáticas mediante la alquilación del DNA, consiguiendo de esta manera una menor capacidad secretora de insulina. Existe evidencia

de que la ingesta de silicio (Si) puede ejercer efectos beneficiosos sobre la salud, principalmente por la elevada capacidad antioxidante que presenta. El objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto protector de un cárnico enriquecido con Si sobre la funcionalidad pancreática de 16 ratas Wistar macho diabéticas. Dichos animales fueron alimentados con dieta obesogénica en ausencia/presencia de Si durante 8 semanas. Los animales se dividieron en dos grupos (n=8): hipercolesterolémico control (H-C) e hipercolesterolémico con Si (H-Si), a los que se les indujo DMT2 a las 3 semanas mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) y nicotinamida (NAD) (65 y 225mg/kg p.c., respectivamente). A las 8 semanas, los animales fueron anestesiados y sacrificados mediante extracción de sangre de la aorta descendente, recogiéndose el páncreas para su estudio. El estudio reveló una disminución significativa en el peso del páncreas en el grupo H-C respecto H-Si (0,54±0,1 vs. 0,72±0,1; p=0,003). Asimismo, el índice pancreático también fue significativamente menor en el grupo H-C (0,15 ± 0,03 vs. 0,19 ± 0,03; p=0,009). Estos datos se relacionan directamente con la glucemia plasmática encontrada, donde H-C mostró una glucemia basal de 9,75±0,41 mmol/L en comparación con 8,04±0,80 mmol/L en el grupo H-Si (p<0,001). El Si disminuye el daño producido por el tratamiento con STZ-NAD, consiguiendo contrarrestar el efecto oxidante y manteniendo una mayor funcionalidad pancreática en un modelo animal de DMT2.

Palabras clave: silicio, toxicidad pancreática, estreptozotocina, diabetes.

TC-P5) EXPOSICIÓN A PRODUCTOS DE CONSUMO REGISTRADOS EN CITUC (CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE) DURANTE 2016.

*González-Berríos F, Silva L.[1], Cerda P.[1], Cid L1, **Medel-Jara P.[1],** Ríos JC[1,2]*

[1] Centro de Información Toxicológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. [2] Departamento de Laboratorios Clínicos, Pontificia Universidad Católica de Chile. [3] Departamento de Salud del Adulto y Senescente, Escuela de Enfermería, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La utilización de productos químicos de uso doméstico otorga variados beneficios para los consumidores, sin embargo, también pueden representar un riesgo para la salud de quienes se exponen a ellos, por esta razón es importante conocer el perfil de exposición de la población a estas sustancias. Objetivo: caracterizar los reportes asociados a exposiciones a productos de consumo general atendidos por el CITUC. Metodología: estudio descriptivo de los casos reportados a CITUC durante el 2016. Se analizaron las variables: edad, sexo, agente, interlocutor, localización del interlocutor e incidente, vía(s) de exposición, síntomas, severidad y tratamientos indicados. Resultados: se reportaron un total de 7.134 casos asociados a exposiciones a productos de consumo general. El grupo etario 2-5 años representa el 56,4% de las exposiciones y el 53,3% de las exposiciones corresponden a individuos de sexo masculino. En relación a la circunstancia de la exposición, el 89,9% de los casos fueron accidentales y el 95,9% de estos ocurrieron en el hogar. Las llamadas fueron mayoritariamente realizadas por médicos (44,2%) y familiares (43,1%). En relación a los agentes involucrados estos corresponden a un total de 7.345 productos, los de mayor incidencia fueron: Cloro doméstico (25%), limpiadores y lustres de pisos (9,56), aguarrás/diluyente (7,15%), limpiadores de cañerías y drenajes (7%), lavaloza (5,08%). La ingestión fue un 77,3%. La mayoría de los pacientes se mantuvieron asintomáticos (56,02%) y de los que presentaron síntomas, solo un 0,2 % de los casos reportaron intoxicaciones severas. Las intoxicaciones accidentales con productos presentes en el hogar son un importante problema, especialmente en los niños menores de 5 años. Si bien estas exposiciones son de baja morbilidad y mortalidad, es importante educar al respecto para prevenir y aumentar la conciencia de la población sobre los posibles riesgos de intoxicaciones con productos presentes en el hogar.

Palabras Claves: Toxicología, Toxicología Clínica, sustancias químicas, sustancias de uso doméstico.

TOXICOLOGÍA VETERINARIA

Comunicaciones orales

***Moderador:** Dr. Francisco Soler Rodríguez.*

TV-O1) INTOXICACIÓN LETAL POR INGESTIÓN DE ETILENGLICOL EN GATO: A PROPÓSITO DE UN CASO

*Navas I[1], **Valverde I[1],** Rubio J[2], García-Fernández AJ[1]*

[1] Servicio de Toxicología y Veterinaria Forense, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100 Murcia, [2] Hospital Veterinario San Antón, Guardamar del Segura, Alicante.

El etilenglicol es un producto con múltiples aplicaciones, pero que se usa comúnmente como anticongelante en el sistema de refrigeración de los automóviles y otros vehículos. Es un líquido incoloro en su forma pura; sin embargo, el usado en los automóviles se comercializa con distintas coloraciones (azulada, verde o rosada). Otros alcoholes, como el propilenglicol también se usa, aunque menos frecuentemente, como anticongelante en automóviles. La intoxicación por etilenglicol ha sido ampliamente descrita, tanto en animales como en personas. En animales la explicación es su sabor dulce. Se presentan los datos clínicos y analíticos de un gato que murió por ingestión de etilenglicol. Se realizaron análisis químicos del contenido gástrico y del hígado. El análisis del contenido fue positivo a etilenglicol, mientras que no se pudo detectar en hígado, debido a la rápida metabolización del compuesto a metabolitos más tóxicos, responsables de la muerte. Los análisis de bioquímica sanguínea se realizaron poco antes de la muerte por lo que permiten explicar la muerte del gato. Se encontraron niveles elevados de glucosa (380 mg/dL, frente a un máximo de 150 mg/dL), BUN (93 mg/dL, frente a un máximo de referencia de 37 mg/dL), creatinina (6,5 mg/dL, frente a un máximo de 2,0 mg/dL) y potasio (7,2 mmol/L frente a un máximo de 5,8 mmol/L). Destaca en el análisis los niveles de Ca muy bajos (3,2 mg/dL, frente a un mínimo de 8,0 mg/dL). El número de neutrófilos y su porcentaje en el contaje celular eran elevados, al igual que la amplitud de distribución eritrocitaria (18,2% sobre un máximo de 17,2%). Fueron bajos, sin embargo, el volumen corpuscular medio (MCV) y la hemoglobina corpuscular media (MCH). No es fácil detectar el compuesto por su rápida absorción y su rápida metabolización hepática. Sin embargo, en este caso se pudo detectar en el contenido gástrico**.**

Palabras clave: Etilenglicol, intoxicación, gato doméstico.

TV-O2) ENVENENAMIENTO EN RAPACES: CASUÍSTICA EN EXTREMADURA (2002-2016)

*Soler F[1], Criado-Martínez R[1], Sánchez-Cuerda S[2], **Martínez-Morcillo S[1],** Oropesa AL[1], Míguez MP[1], Pérez-López M[1]*

[1] Área de Toxicología, Facultades de Veterinaria y de Ciencias. Universidad de Extremadura, España. [2] Centro de Recuperación y Educación ambiental "Los Hornos", Sierra de Fuentes, Cáceres, España.

Extremadura atesora una rica biodiversidad en poblaciones de aves rapaces, estando incluidas muchas de ellas, en el Catálogo Español de Especies Amenazadas. Estas especies son las principales víctimas del uso de cebos envenenados, por lo que este estudio recogemos la incidencia de envenenamientos en rapaces entre los años 2002-2016, estudiados en base al convenio de nuestro laboratorio con la Junta de Extremadura a través del Protocolo regional de lucha contra venenos en el medio ambiente. Se han recopilado datos de 523 aves rapaces analizadas, siendo positivas a envenenamiento el 44,7% de ellas. El grupo de compuestos responsable de los envenenamientos ha sido el de los plaguicidas carbamatos (70% del total, con carbofurano en el 43 % y aldicarb en el 21% de los positivos), seguido de organofosforados (28%). Las especies más afectadas fueron los buitres y los milanos, sumando el 85% del total de envenenamientos (80 ejemplares de buitre leonado, 52 de milano real, 39 de buitre negro y 28 de milano negro) seguidos del ratonero (11), el águila imperial ibérica (8) y el alimoche (6). En el citado periodo se han analizado un

total de 160 cebos sospechosos, resultando positivos el 78% de los mismos, siendo detectado aldicarb en el 45% y carbofurano en el 23% de los mismos. La época del año en la que más animales muertos por envenenamiento y más cebos envenenados se han encontrado es la primavera. La incidencia provincial de envenenamientos fue de un 60% en Cáceres y 40% en Badajoz, si bien el mayor número de cebos encontrados fue mayor en Badajoz (60%) que en Cáceres (40%). Estos datos ponen de manifiesto la gravedad del uso de cebos envenenados por cuanto las rapaces afectadas están incluidas en diversas formas de protección.

Agradecimientos: a la Junta de Extremadura (Consejería de Economía e Infraestructuras) y a los fondos FEDER a través de las ayudas regionales a los grupos de investigación GR18.

Palabras clave: envenenamiento, rapaces, Extremadura.

Comunicaciones tipo póster

TV-P1) VALORES DE REFERENCIA DE ZN EN SANGRE EN *AGAPORNIS SPP.* PARA EL DIAGNÓSTICO DE INTOXICACIÓN

*Cuerel J[1], **Navas I[2],** García-Fernández AJ[2]*
[1] Clínica Veterinaria Pluto, Murcia. [2] Servicio de Toxicología y Veterinaria Forense, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100 Murcia

La determinación de la concentración de zinc en sangre de aves psitácidas es frecuentemente solicitada por los clínicos veterinarios debido a un mayor conocimiento de la toxicidad del zinc y por la tendencia de estas especies a explorar objetos metálicos resultando en un mayor riesgo de intoxicación. Sin embargo, la interpretación de los resultados aún no está clara ya que a menudo se basa en las concentraciones normales establecidas para aves de corral, siendo muy probable que existan diferencias entre especies. Además, existen fluctuaciones diurnas de estos niveles y la concentración sanguínea de zinc puede verse drásticamente alterada también por el zinc de la dieta o el estado fisiológico. No existen datos concluyentes sobre la toxicidad del zinc en aves de compañía. Habiendo realizado n=14 determinaciones de los niveles de zinc en sangre en *Agapornis spp*. mediante la técnica desarrollada por el Servicio de Toxicología de la Universidad de Murcia, basada en Voltamperometría de Redisolución Anódica (ASV), hemos observado que los valores obtenidos, tanto en animales sanos como en animales sospechosos de intoxicación, así como en los tratados con terapia quelante, son sensiblemente superiores a los niveles que se establecen como "normales" para otras especies, por lo que se pueden estar considerando animales como intoxicados cuando no lo están. La interpretación de niveles intermedios de zinc debe incluir otra información clínica y diagnóstica para respaldar un diagnóstico de toxicosis por zinc. El objetivo del estudio es recopilar información de concentraciones en sangre de zinc en *Agapornis spp*, relacionados con diferentes grados de exposición a zinc, de muestras obtenidas de casuística de la clínica diaria, aplicando variables que puedan afectar a dichas concentraciones como alimentación, variaciones estacionales y estado clínico.

Palabras clave: *Agapornis spp*, toxicosis, zinc, diagnóstico, intoxicación

TV-P2) ENVENENAMIENTOS EN EL MEDIO NATURAL EN LA PROVINCIA DE ALICANTE EN LOS ÚLTIMOS CINCO AÑOS (2013-2017)

*Navas I[1], María-Mojica P[1,2], **García-Fernández AJ[1]***
[1] Servicio de Toxicología y Veterinaria Forense, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, Murcia. [2] Centro de Recuperación de Fauna Silvestre "Santa Faz" (Alicante), Servicio de Vida Silvestre, Generalitat Valenciana.

El envenenamiento de animales es perseguido como delito desde 1995. Al principio bajo la forma de caza no selectiva y ahora ya aplicado a todas las especies animales. Cada comunidad autónoma tiene la obligación de poner en marcha los mecanismos para proteger la fauna y perseguir los delitos relacionados con el veneno en el medio natural. Este trabajo recopila los envenenamientos investigados en la Provincia de Alicante durante los últimos 5 años (2013-2017). Se han investigado 72 casos, de los que 12 solo se tenía muestra de cebo. En los otros 60 había animales envenenados. Del total, en 27 casos había resultados analíticos sobre cebos, de los cuales más de la mitad eran de carne o embutidos y una tercera parte eran cebos comerciales (rodenticidas anticoagulantes sobre todo). Se han visto involucradas 95 víctimas, casi la mitad de ellas eran animales de compañía (perros 73% y gatos 27%) que sirven de centinela del uso de los venenos en el medio. En relación a mamíferos silvestres, 10 de los 17 individuos eran zorros. La suma de zorros y perros llegó a 46, lo que supone un 48% del total. En cuanto a las aves destacó un caso en el que murieron 14 golondrinas. Entre los tóxicos implicados en envenenamientos en Alicante, el 50% son carbamatos, casi todos aldicarb, seguido de rodenticidas anticoagulantes (12%) y organofosforados (3%). El porcentaje de casos de no detección del supuesto veneno implicado asciende a 18 casos (24%). Se ha detectado también metaldehído en un caso. Conclusión: se hace necesario mejorar los métodos de investigación toxicológica y forense para reducir el número de casos de no detección.

Agradecimientos: Al SUIC por el apoyo analítico en algunos de los casos investigados.

Palabras clave: Veneno, envenenamiento, carbamatos, rodenticidas anticoagulantes.

TV-P3) PORPHYRIN LEVELS IN EXCRETA OF RABBIT AS NON-DESTRUCTIVE BIOMARKERS OF EXPOSURE TO LEAD ACETATE

***Kaddour Ziani[a],** David Hernández-Moreno[b,c], Meghit Boumedienne khaled[d], Francisco Soler[b], M. Prado Míguez[b], Marcos Pérez-López[b].*
[a] Laboratory of Biotoxicology, Pharmacognosy and Biological Valorization of Plants. Department of Biology, Taher Moulay University of Saida, 20.000 Algeria. [b] Toxicology Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University of Extremadura, Avda de la Universidad s/n, 10003 Caceres, Spain. [c] Universidad Autónoma de Chile. Chile. [d] Health and Environment laboratory. Djillali Liabes University of Sidi-Bel-Abbes B.O 89. Sidi-Bel-Abbes. 22.000. Algeria.

Lead (Pb) is known to disrupt biochemical and physiological functions, which leads to dysfunction. The main objective of this study was to validate the use of porphyrin profile in faeces of rabbit as non-destructive biomarkers for monitoring mammal exposure to lead acetate. Twenty-four white rabbits (12/12 females/males) were gathered into three groups (one control and two exposed) according to their sex. The experimental groups were exposed to two doses (1/100 and 1/50 of LD 50 for rats) and faeces of all groups were sampled at the start, and every 10 days till the end of the experiment (30 days). The obtained results were characterized by significantly increased concentrations of coproporphyrin (CP) and 7-carboxyporphyrin (7-CBX) with a clear predominance of uroporphyrin I (UPI) respect to their control. To infer, a key finding in this study was usefulness of porphyrin profiles in male populations exposed to lead acetate as non-destructive biomarkers.

Keywords: Biomarkers, Excreta, Lead exposure, Non-destructive, Porphyrins.

TV-P4) MUNICIÓN DE PLOMO Y RAPACES: CASO CLÍNICO EN ÁGUILA REAL TRAS DISPARO

***Soler F[1],** Sánchez-Cuerda S[2], Martínez-Morcillo S[1], Oropesa AL[1], Míguez MP[1], Pérez-López M[1]*
[1]Área de Toxicología, Facultades de Veterinaria y de Ciencias. Universidad de Extremadura, España. [2]Centro de Recuperación de Fauna y Educación ambiental "Los Hornos", Sierra de Fuentes, Cáceres, España.

Entre los distintos tóxicos que afectan a la fauna el plomo ocupa un lugar destacado. Entre las causas de las posibles intoxicaciones en aves rapaces se deben destacar la ingestión de presas con restos de munición de plomo o de la propia contaminación ambiental en zonas afectadas, sobre todo por actividades mineras. Son escasos los estudios sobre el efecto del plomo presente en el organismo de las aves

como consecuencia de disparos de munición de plomo. En este trabajo se presenta un caso ocurrido en un águila real que ingresó en el centro de recuperación tras haber sido disparada con perdigones de plomo desde una corta distancia. A la exploración mediante rayos X se observaron un total de 42 perdigones alojados en su cuerpo, siendo posible únicamente la extracción de 4 de ellos situados muy superficialmente. El animal no murió y se recuperó lentamente no siendo tratada con quelantes, y administrándole comida controlada. Al cabo de 9 meses y previo a su suelta se realizó una analítica de sangre para comprobar los niveles de Pb, Cd, Se, As y Hg. El resultado de Pb (308,02 µg/L) indicó unos niveles compatibles con intoxicación subclínica, por lo que se decide no dejarla en libertad y realizarle un tratamiento con EDTA. Tras él los niveles disminuyeron hasta 67 µg/L, y al cabo de las 2 y 6 semanas se mantuvieron entre 87-88 µg/L, niveles sin riesgo por lo que se procedió a su liberación tras un nuevo tratamiento. Se constató la efectividad el tratamiento con EDTA sobre el Pb sanguíneo, que también produjo una disminución importante en los niveles de Hg y de Se, mientras que no afectó a los de As y Cd que siempre fueron inferiores al límite de cuantificación.

Palabras clave: plomo, águila, perdigones, disparo**.**

Agradecimientos: a la Junta de Extremadura (Consejería de Economía e Infraestructuras) y a los fondos FEDER a través de las ayudas regionales a los grupos de investigación GR18.

TV-P5) APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA QuEChERS EN EL DIAGNÓSTICO DEL ENVENENAMIENTO POR ESTRICNINA

Soler F[1], *Martínez-Morcillo S[1], Oropesa AL[1], Míguez MP[1], Pérez-López M[1], Silva A[2]*

[1] Área de Toxicología, Facultades de Veterinaria y de Ciencias. Universidad de Extremadura, España. [2] SiPA. Servicio de análisis e innovación en productos de origen animal. SAIUEx. Universidad de Extremadura, España.

El método QuEChERS (acrónimo en inglés de rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro) es una técnica de preparación de muestras sencilla y directa, ideal para el análisis multiresiduo de plaguicidas y otros compuestos en distintas matrices orgánicas e inorgánicas. Entre los compuestos utilizados en la elaboración de cebos envenenados aún se sigue utilizando el alcaloide estricnina, particularmente en las zonas del norte de España. El objetivo de este trabajo es evaluar la aplicación de la metodología QuEChERS, que actualmente estamos utilizando para otros venenos, en el análisis de estricnina en muestras orgánicas de animales supuestamente envenenados. Para ello se tomaron muestras de sangre e hígado que se adicionaron con distintas concentraciones de estricnina. Tras extracción con acetonitrilo, el extracto se purificó mediante distintas combinaciones de sulfato de magnesio y sorbentes (C18, PSA y Florisil) en la fase dispersiva, procediendo a la identificación y cuantificación mediante un sistema UHPLC-MS (QqQ). El método se comprobó que era selectivo, y las calibraciones en las matrices tuvieron una buena linealidad (r>0.99). El límite de cuantificación del método, basado en la relación señal/ruido, fue de 1 ng/g. El comportamiento en la recuperación de la estricnina tras la purificación con distintos sorbentes fue variable, y así no se obtuvieron buenas recuperaciones cuando se utilizó el C18, tanto de forma conjunta con PSA y/o Florisil, como de forma única, y en diferentes proporciones. La mejor recuperación (>82%) se produjo cuando se utilizó PSA como único sorbente en la fase dispersiva. Igualmente, se comprobó una recuperación muy buena (94-103%) cuando el extracto no se purificó, sino que se diluyó directamente en acetonitrilo. Sin embargo, este último hecho produce una mayor posibilidad de introducir suciedad en el sistema cromatográfico, con el consiguiente aumento de las operaciones de mantenimiento y disminución de la operatividad del laboratorio.

Agradecimientos: a la Junta de Extremadura (Consejería de Economía e Infraestructuras) y a los fondos FEDER a través de las ayudas regionales a los grupos de investigación GR18.

Palabras clave: estricnina, QuEChERS, diagnóstico, envenenamiento.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Comunicaciones orales

Moderador*: Dr. Rafael Balaña Fouce*

MA-O1) ESTUDIO DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DE CILINDROSPERMOPSINA, MICROCISTINA-LR Y SU MEZCLA EN LA LÍNEA NEURONAL SH-SY5Y

Hinojosa MG, *Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Jos A, Cameán AM*

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, España.

El aumento de la aparición de floraciones de cianobacterias en las últimas décadas supone un importante problema de salud pública, debido a su ubicuidad y a su capacidad de producir diferentes cianotoxinas, entre las que destacan la microcistina-LR (MC-LR) y la cilindrospermopsina (CYN). Ambas cianotoxinas presentan diferentes efectos tóxicos, principalmente hepatotoxicidad y citotoxicidad, respectivamente. Cabe mencionar, que recientemente se han publicado diferentes estudios respecto a la neurotoxicidad inducida por MC-LR y CYN, siendo abundantes en el caso de la MC-LR, y escasos en el caso de la CYN. Además, ambas cianotoxinas pueden encontrarse presentes en una misma floración. Sin embargo, los estudios referentes a esta combinación son escasos, por lo que sería de gran interés realizar estudios sobre los efectos neurotóxicos de la mezcla de ambas toxinas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos citotóxicos de ambas toxinas por separado y en combinación en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, usando para ello los ensayos de la reducción de una sal de tetrazolio (MTS), la captación de rojo neutro (RN) y el contenido proteico (CP). Las células se expusieron a un rango de concentraciones de 0-100 µg/mL MC-LR y 0-10 µg/mL CYN durante 24 y 48 horas. Tras este tiempo de exposición, se calcularon las concentraciones efectivas medias (CE_{50}), resultando ser el MTS el indicador más sensible. Para MC-LR, los valores de CE_{50} fueron 32,21±1,89 µg/mL y 20,8±2,08 µg/mL, tras 24 y 48 horas, respectivamente. Para CYN fueron 0,87±0,13 µg/mL y 0,32±0,08 µg/mL. Para la evaluación de la citotoxicidad de la mezcla se emplearon los valores CE_{50} de cada cianotoxina así como diferentes fracciones de éstas. Así, se obtuvieron valores más marcados de citotoxicidad que con las toxinas por separado, si bien al ser analizados mediante el programa CalcuSyn, se observó un efecto antagónico a concentraciones bajas, mientras que a concentraciones superiores se vislumbra un efecto sinérgico. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial neurotóxico de ambas toxinas *in vitro* tanto individualmente como en combinación.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE). Servicio de Biología del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

Palabras clave: cilindrospermopsina, microcistina, neurotoxicidad, SH-SY5Y, citotoxicidad

MA-O2) ESTUDIO METABÓLICO Y DE CARCINOGÉNESIS DE NUEVOS DERIVADOS DE TACRINA PARA EL POTENCIAL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Ramos E[1], *Del Pino J[1], Frejo MT[1], Marco-Contelles J[2], Romero A[1]*

[1] Área de Toxicología. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid. España. [2]Laboratorio de Química Médica (IQOG, CSIC);3, Juan de la Cierva; 28006-Madrid. España.

Los métodos "*in silico*" cobran cada vez una mayor relevancia por su capacidad para predecir los valores de toxicidad de nuevas moléculas con interés terapéutico. Su uso nos permite un cribado más eficiente a la hora de seleccionar los compuestos que poseen un perfil más seguro, para un posterior desarrollo preclínico de los mismos. En la última década se ha trabajado intensamente en la síntesis y desarrollo de pequeñas moléculas derivadas de tacrina con el objetivo, no sólo de ralentizar las principales manifestaciones fisiopatológicas de la

enfermedad de Alzheimer sino también de disminuir la hepatotoxicidad causada en muchos pacientes, lo que ocasionó su retirada. En este contexto, se han desarrollado una serie de derivados de tacrinas; piranotacrinas, piranopirazolotacrinas hupertacrinas, isoxazolotacrinas, cromenotacrinas y β-naftotacrinas, cuya hepatotoxicidad ha sido previamente evaluada *in vitro*, evidenciándose un descenso de toxicidad estadísticamente significativo con respecto a tacrina. Basándonos en estos datos, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar el metabolismo y posible riesgo carcinogénico de estas moléculas respecto a tacrina. Para la consecución de este objetivo nos basamos en sistemas de predicción *in silico* de metodología basadas en reglas de experto y métodos estadísticos validados. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto; i) la excelente correlación existente entre los datos obtenidos *in vitro* y los datos *in silico* ii) la posibilidad de identificar y seleccionar el compuesto con mejor perfil metabólico y que carezca de efectos carcinogénicos para un posterior desarrollo preclínico y iii) predecir nuevos mecanismos de acción que nos ayuden a entender las manifestaciones toxicológicas a las que puedan dar lugar las moléculas analizadas. En conclusión, podemos afirmar que los sistemas de predicción *in silico* validados son poderosas herramientas de cribado toxicológico para el desarrollo y evaluación de nuevos compuestos de interés terapéutico.

Palabras clave: *in silico*, metabolismo, carcinogénesis, derivados de tacrina, enfermedad de Alzheimer

Comunicaciones tipo póster

MA-P1) NANOVECTORES DE ÁCIDO TÁNICO EN QUIMIOTERAPIA: SÍNTESIS Y EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA EN CÉLULAS HEPÁTICAS

Corona-Corrales S[1], *Maisanaba S[2], González-Galán C[1], Aparicio-Muriana MM[2], Repetto G[2], Sayagués MJ[3], Zaderenko AP[1]*

[1] Área de Química Física, Departamento de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla, España. [2] Área de Toxicología, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla, España. [3] Instituto de Materiales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sevilla, España.

Uno de los mayores inconvenientes de la quimioterapia es su falta de especificidad tisular, la cual es responsable de sus graves efectos adversos, derivados, a su vez, de la toxicidad que ejercen estos fármacos al interactuar con los tejidos sanos del paciente. Con la intención de reducir dichos efectos, la nanotecnología se ha establecido como una de las soluciones más plausibles hasta el momento y, dentro de ella, las nanopartículas poliméricas constituyen uno de los sistemas más usados para el direccionamiento de agentes antitumorales. Entre los productos naturales polifenólicos con actividad antitumoral destaca el ácido tánico (AT), ya que su mecanismo de acción involucra a importantes receptores de membrana sobreexpresados en numerosos tipos de tumores. No obstante, y pese a esta "relativa selectividad", el AT no está exento de efectos secundarios, lo que hace necesarios tanto su direccionamiento, es decir, vectorización a un receptor concreto, como su evaluación toxicológica en ausencia de dicha vectorización. Nuestro grupo ha desarrollado nanopartículas poliméricas capaces de encapsular AT con una eficiencia extremadamente elevada, y que se pueden dirigir selectivamente a células tumorales que sobreexpresan los receptores vinculados a su actividad. Estas nanopartículas han sido caracterizadas, y han demostrado poseer unos parámetros físico-químicos óptimos para su aplicación biomédica. Además, hemos evaluado la posible citotoxicidad y estrés oxidativo en células de hepatoblastoma hepático humano, como modelo fármaco-toxicológico. De los biomarcadores estudiados en los ensayos de citotoxicidad, captación de rojo neutro y metabolización de una sal de tetrazolio, sólo mediante el último se ha observado un descenso en la viabilidad tras 48h de exposición. Los estudios preliminares de estas nanopartículas son muy prometedores, por lo que se están ampliando para establecer modelos de aplicación *in vivo*.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (CTP2016-80206-P y CTM2012-31344), Programa FEDER, proyectos puente de la Universidad Pablo de Olavide (GR).

Palabras clave: Ácido tánico, nanopartículas, cáncer.

MA-P2) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD *IN VITRO* EN CÉLULAS A431 Y HDF DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO TÁNICO DESTINADAS A TRATAMIENTOS ANTITUMORALES

Maisanaba S[1], *Corona-Corrales S[2], Aparicio-Muriana MM[1], Rojas R[1], del Peso A[1], Repetto MR[1], Zaderenko AP[2], Repetto G[1]*

[1] Área de Toxicología, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España. [2] Área de Química Física, Dpto. de Sistemas Físicos, Químicos y Naturales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.

El ácido tánico (AT), producto natural perteneciente a la familia de los taninos, es una molécula compleja debido a su comportamiento dual. Así, dependiendo de la concentración empleada, podrá presentar propiedades anticarcinogénicas o bien actividad proapoptótica, siendo una prometedora opción en la terapia antitumoral. Otra característica importante del AT es que su actividad se ha asociado con receptores que controlan la proliferación no deseada de células, como es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Aunque actualmente es valorado muy positivamente en aplicaciones biomédicas, entre los factores limitantes para su uso destacan su interacción con otros receptores y, por tanto, sus posibles efectos secundarios, así como su tamaño micrométrico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* la citotoxicidad basal y la capacidad de generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) de nanopartículas de AT (0-200µg/mL) destinadas a tratamientos antitumorales. Para ello, se seleccionaron dos líneas celulares epiteliales de origen humano, una tumoral con una elevada expresión de EGFR, y otra sana, con una insignificante expresión del receptor. Los biomarcadores seleccionados para el estudio de la citotoxicidad fueron el ensayo de captación de rojo neutro (RN) y la reducción de la sal de tetrazolio MTT, con objeto de evaluar el daño lisosomal y mitocondrial, respectivamente, tras 4, 24 y 48h. Además, se llevó a cabo la evaluación de la generación de ERO mediante el ensayo de fluorescencia DCFH. Los resultados preliminares muestran que ambas líneas celulares sufren un descenso de la viabilidad tras los tiempos de exposición más largos, siendo más acusada esta disminución en las células A431. Además, las concentraciones más altas de exposición de nanopartículas (100-200µg/mL) inducen ERO en las condiciones estudiadas en las líneas celulares. Serían necesarios más estudios para dilucidar los posibles mecanismos de acción de estas nanopartículas destinadas a tratamientos antitumorales.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (CTP2016-80206-P y CTM2012-31344), Programa FEDER, Proyectos Puente UPO 2017 (GR).

Palabras clave: Nanopartículas, ácido tánico, cáncer, citotoxicidad, ERO.

MA-P3) CYTOTOXIC AND INTERACTIVE EFFECTS OF STERIGMATOCYSTIN AND NIVALENOL IN CELL CULTURE: A REVIEW

Fedeli C[1],Fernández-Franzón M[2], Font G[2], ***Ruiz MJ[2]***

[1] Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Italy. [2] Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain.

Nivalenol (NIV) and Sterigmatocistyn (STE) are secondary metabolites produced by different genera of fungi, *Fusarium* and *Penicillium*, respectively. The natural co-occurrence of these mycotoxin has been found in several food and feeds commodities and this contamination is a significant health concern for human beings. However, health risk assessment are usually based on one single mycotoxin. This study is a review of published data about the cytotoxic effects of NIV and STE alone and in combination with other mycotoxins and the type of interaction between them. The interaction

effect of mycotoxin mixtures mainly include three different effects: synergy, additivity and antagonism. According to the isobologram methods, the type of interaction is defined by the combination index (CI) as follow: CI<1, CI=1, CI>1 means synergistic, additive and antagonistic effect, respectively. The results shown that NIV and STE produced cytotoxic effect in cell culture when they were tested alone and in binary, tertiary and quaternary combinations. NIV and STE tested alone caused a reduction of cell viability in a dose-and time-dependent manner.NIV and/or STE were found mainly in mixtures with deoxynivalenol (DON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), beauvericin (BEA), citrinin (CTN), enniantin B (ENNB), fumosin B1 (FB1), fusareon-X (FX), ochratoxin A (OTA), patulin (PAT), T-2 toxin (T2) and zearalenone (ZEA). Mycotoxins combinantions showed a dose-dependent interaction effects, which varies depending on the mycotoxins in the mixture and the range of concentration used, showing synergistic, additive or antagonistic effect. In conclusion, simultaneous presence of mycotoxins in food could increase toxic risk to human and animal health. Therefore, a better understanding of their mechanisms of action and, the toxicological effects of their interactions in living organisms is required.

Keywords: nivalenol, sterigmatocystin, cytotoxicity, co-exposure, interaction effects

Acknowledgement: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-77610-R).

MA-P4) ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO POR EXPOSICIÓN A CILINDROSPERMOPSINA, MICROCISTINA-LR Y SU MEZCLA EN LA LÍNEA NEURONAL SH-SY5Y

Hinojosa MG, *Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Jos A, Cameán AM*
Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, España.

Cilindrospermopsina (CYN) y Microcistina-LR (MC-LR) son metabolitos secundarios originados por algunas especies de cianobacterias, y son comúnmente denominados cianotoxinas. Éstas han demostrado presentar diferentes efectos tóxicos en distintos organismos, entre los que se encuentran los seres humanos. Clasificadas como citotoxina (CYN) y hepatotoxina (MC-LR), diversos estudios ponen de manifiesto el potencial tóxico de ambas moléculas para otras dianas, tal y como el sistema nervioso. Por otro lado, ambas toxinas han mostrado su capacidad para producir estrés oxidativo, aunque esto no se ha demostrado a nivel del sistema nervioso humano. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la producción de estrés oxidativo inducido por ambas toxinas, valorando para ello los niveles de glutatión reducido (GSH) y la aparición de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y durante 4, 8, 12 y 24 horas. Además, también se realizó un estudio del efecto que podría tener sobre estos parámetros la combinación de ambas toxinas, dato interesante teniendo en cuenta que en la naturaleza podrían aparecer combinadas. Las concentraciones de exposición empleadas consistieron en los valores de CE_{50} para cada cianotoxina obtenidos en estudios previos de citotoxicidad, así como diferentes fracciones de éstos. Los resultados no muestran una afectación de los niveles de ERO con ninguna de las concentraciones de exposición, aunque sí se produjo una disminución de los niveles de GSH a las 24 horas en todas las concentraciones ensayadas, e incluso a las 12 horas en la concentración más alta de MC-LR ensayada, y una disminución a las primeras horas en el caso de la mezcla, sugiriendo una participación del GSH en la eliminación de ERO.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2015-64558-R, MINECO/FEDER, UE). Servicio de Biología del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

Palabras clave: cilindrospermopsina, microcistina, SH-SY5Y, estrés oxidativo, neurotoxicidad.

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Comunicaciones orales

Moderador: *Dr. Fernando Gil Hernández.*

TA-O1) EFECTOS DE LOS LIXIVIADOS DE PINTURAS ANTI-INCRUSTANTES EN *Daphnia magna*

Hernández-Moreno D[1], *Vílchez A[2], Muñoz JL[2], Vázquez-Campos S[2], Fernández-Cruz ML[1]*
[1] Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carretera de la Coruña Km 7.5, Madrid, España. [2] Centro Tecnológico LEITAT, Terrassa (Barcelona), España.

Las pinturas anti-incrustantes se utilizan para frenar el crecimiento y facilitar el desprendimiento de organismos subacuáticos de embarcaciones. El óxido de zinc (ZnO) es un componente usado en estas pinturas, por su efecto protector frente a la radiación ultravioleta y frente a la velocidad de pulido de la película, evitando la liberación al agua de sustancias activas tales como el cobre (Cu). El presente estudio evalúa la influencia de la sustitución del ZnO micrométrico por ZnO nanométrico sobre las propiedades finales de la pintura, en relación a la liberación de iones metálicos y su efecto en organismos acuáticos modelo (*Daphnia magna*). Se utilizó una pintura anti-incrustante comercial estándar cuya formulación contiene cobre (Cu-piritión, Cu y CuO) y ZnO, en tamaño micrométrico, así como tres pinturas con sustitución del ZnO micrométricas por nanopartículas (NPs) de ZnO recubiertas (una hidrofílica y 2 hidrofóbicas). Se realizaron simulaciones de lixiviación de Cu y Zn por inmersión de paneles impregnados con las pinturas en medio de *Daphnia magna*. La caracterización del tamaño de las NPs liberadas en los medios se realizó mediante TEM y DLS, evaluándose las concentraciones de metales por ICP-MS. Además, se estudió la toxicidad aguda de los lixiviados para las Daphnias (OCDE nº 202) empleando un Daphtoxkit (MicroBioTests, Bélgica). Los resultados mostraron que los lixiviados de las pinturas con ZnO micro o nano ejercen el mismo efecto tóxico. Los niveles de Zn liberados en el medio de Daphnia fueron similares para todas las pinturas, sin embargo, la liberación de Cu fue entre un 25% y un 55% menor en las pinturas con NPs de ZnO. En conclusión, las NPs de ZnO mitigan la liberación de Cu al medio, lo que supone una mejora en las propiedades anti-incrustantes, sin un aumento de toxicidad.

Agradecimientos: Proyecto del 7PM de la Comunidad Europea 604387 GUIDEnano

Palabras clave: nanomaterial, invertebrados, cobre, zinc

TA-O2) NIVELES DE MERCURIO EN PLUMAS DE CÓNDOR ANDINO (*VULTUR GRYPHUS*) Y OTROS CATÁRTIDOS DEL CONTINENTE AMERICANO EN EL PERIODO 2007-2017.

Di Marzio A[1]*, Lambertucci SA[3], García-Fernández AJ[1,2] , Martínez-López E[1,2]*
[1] Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo. 30100. Universidad de Murcia, España. [2] Laboratorio de Toxicología, Instituto de investigación Biomédica (IMIB-Arrixaca), Campus de Espinardo, 30100, Universidad de Murcia, España. [3] Grupo de Biología de la Conservación, Laboratorio Ecotono, INIBIOMA (CONICET-Universidad Nacional del Comahue), Bariloche, Argentina

El uso de aves silvestres como centinelas de contaminación ambiental está ampliamente extendido siendo útil para obtener información sobre compuestos persistentes, bioacumulativos y tóxicos, como el mercurio (Hg), presentes en el medio, así como para conocer posibles efectos patológicos sobre estas especies u otras que compartan el mismo territorio. Bariloche se encuentra en el noroeste de la Patagonia Argentina. Se trata de un área agreste, con baja densidad humana, donde el turismo y la ganadería representan las principales actividades. Sin embargo, la intensa actividad volcánica de la cordillera andina, en su lado chileno, y las erupciones producidas en la última década representan una fuente de emisión importante de Hg en esta área. Algunos estudios han utilizado catártidos como especies subrogadas para evaluar la exposición de contaminantes en especies amenazadas o emblemáticas, como el Cóndor andino (*Vultur gryphus*). En nuestro trabajo, primero en la zona, determinamos los niveles de Hg en plumas primarias (n=179) de *Vultur gryphus* (n=50),

Coragyps atratus (n=65) y *Cathartes aura* (n=64) muestreadas en dormideros de Bariloche entre los años 2007 y 2017. Los resultados muestran diferencias significativas en concentraciones entre las especies estudiadas con medias (medianas) de 0,037 (0,033); 0,36 (0,17) y 1,28 (0,23) mg/kg en *V.gryphus*, *C.atratus*, *C.aura*, respectivamente, siendo los valores de *V.gryphus* 10 y 40 veces inferiores a las otras dos especies. Se ha evidenciado como la concentración por Hg sigue el mismo patrón cronológico en las tres especies, con un incremento de concentración hasta el 2013 dónde se registran los valores más altos (medias de 0,05; 0,44 y 2,44 mg/kg en *V.gryphus*, *C.atratus* y *C.aura*). *A priori*, nuestros resultados parecen indicar que *C.atratus* y *C.aura*, podrían ser usadas como especies subrogadas de *V.gryphus* al reflejar el mismo patrón cronológico. Además, estas variaciones podrían reflejar la actividad volcánica en la última década, si bien habría que profundizar en los estudios incluyendo variables como sexo, alimentación y condiciones climáticas.

Agradecimientos*:* Fundación Séneca, proyecto MASCA (Monitorización con Animales Silvestres de la Contaminación Ambiental, 19481/PI/14) y PICT (0725/2014) por la financiación recibida.

Palabras clave: Cathartidae, Hg, Biomonitores, Patagonia, Plumas

Comunicaciones tipo póster

TA-P1) RELACIÓN DE LA FECUNDACIÓN CON LA EXPOSICIÓN A PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN HUEVOS DE AGUILUCHO CENIZO (*Circus pygargus*)

Navas I, *María-Mojica P, Martínez-López E, García-Fernández AJ. Laboratorio de Toxicología, Dpto. Ciencias Sociosanitarias, Instituto de Investigación Biosanitaria de Murcia (IMIB-Arrixaca-UM), Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.*

Los efectos sobre la fertilización y el éxito en la incubabilidad son parámetros estudiados frecuentemente en situaciones de exposición a contaminantes ambientales persistentes. Este interés es aún mayor en aquellos compuestos que han mostrado tener efectos disruptores endocrinos, como es el caso de muchos pesticidas organoclorados. El uso de estos compuestos durante décadas en las zonas agrícolas puede haber influido en las dinámicas poblacionales de ciertas especies. Por otro lado, su estudio ofrece información que se puede utilizar para estimar o predecir efectos sobre especies en delicado estado de conservación o sobre la especie humana. En este trabajo se han analizado los niveles de 16 pesticidas organoclorados en 55 huevos no eclosionados de Aguilucho cenizo (25 fecundados y 30 no fecundados) de un área mediterránea de histórica actividad agrícola. Lindano, heptacloro, endosulfán I, dieldrín y *p,p'*-DDE fueron los más representativos de cada uno de sus grupos químicos. La suma de estos compuestos suponía el 95 y 96% de la carga total de organoclorados en huevos, independientemente de la fecundación. Las medias en huevos fecundados fueron superiores, a excepción del dieldrín, donde la concentración en no fecundados era diez veces mayor que en fecundados (0,20 frente a 0,02 µg/g lípido). El *p,p'*-DDE, producto principal de la degradación del DDT, fue el único derivado difenilalifático detectado, tanto en todos los huevos fecundados (11,4±15,6; 0,21-63,19 µg/g lípido) y en 29 de los 30 no fecundados (18,0±17,4; 1,50–65,15 µg/g lípido). En el caso del endosulfán el único isómero detectado fue el endosulfán I, y solamente en 4 de los 25 huevos fecundados. Los resultados parecen indicar que la exposición a estos compuestos tiene efectos sobre la viabilidad de los huevos, bien sobre la fertilidad en el caso del dieldrín, o bien sobre el éxito final de la puesta en el caso del DDE.

Agradecimientos: A la Junta de Andalucía y a EGMASA, por permitir el uso de las muestras de este estudio y la financiación de los análisis.

Palabras clave: Organoclorados, Aguilucho cenizo, *Circus pygargus*, Huevos, Fecundación.

TA-P2) CARACTERIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS EN LA COSTA MEDITERRÁNEA

Marín-Dalmau S[1], Santos-Echeandía J[1], Campillo JA[1], **Ruiz MJ[2]**
[1] Instituto Español de Oceanografía, *Centro Oceanográfico de* San Pedro del Pinatar, Murcia. [2] Laboratorio de Toxicología. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Av. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot, Valencia, España.

Las actividades antrópicas como la industria o la minería son las principales portadoras de mercurio (Hg) al Mar Mediterráneo. Este trabajo tiene por objetivo evaluar el riesgo toxicológico y ecotoxicológico del Hg en la costa mediterránea española, en el marco del Proyecto 2-2 ESMARME desarrollado por el Instituto Oceanográfico de Murcia. Para ello, se seleccionan dos especies bioindicadoras de la contaminación marina, el salmonete (*Mullus barbatus)* y el mejillón *(Mytilus galloprovincialis)*. Los salmonetes se capturaron en 6 de los principales caladeros de la Demarcación Levantino-Balear y los mejillones en 15 zonas de muestreo a lo largo del litoral Ibérico. Se determina la concentración de Hg en las muestras analizadas y se compara con el límite máximo establecido para consumo humano de Hg en salmonetes (4,15 mg/Kg p.s.) y en mejillón (2,5 mg/Kg p.s.) por la legislación europea. Así mismo se comparan con criterios de evaluación basal de Hg para el medio ambiente en salmonetes (0,600 mg/Kg p.s.) y en mejillón (0,188 mg/Kg p.s.). Las concentraciones de Hg obtenidas en salmonetes (de 0,43±0,37 a 0,92±0,46 mg/Kg p.s.) fueron mayores que las obtenidas para el mejillón (de 0,08±0,00 a 0,48±0,02 mg/Kg p.s.), pero en ningún caso se superan los límites establecidos para consumo humano; por lo que no existe riesgo para la salud humana. Respecto a los valores medioambientales establecidos, las mayores concentraciones de Hg se registraron en las áreas costeras más antropizadas; se superaron las concentraciones de Hg en los salmonetes procedentes de 3 de los 6 caladeros de la demarcación seleccionada y en el caso de los mejillones en 4 de las 15 zonas de litoral muestreadas. Por tanto, es importante controlar las áreas vulnerables del litoral mediterráneo expuestas a los principales focos de contaminación antrópica por Hg para cumplir con los criterios internacionales de calidad ambiental.

Agradecimientos: Este estudio se llevó a cabo dentro de los Proyectos de MEDPOLIEO (2-ESMARME y 2,2-ESMARME) financiados por el Ministerio de Medio Ambiente Español.

Palabras claves: mercurio, bioindicadores, contaminación marina, Mediterráneo.

TA-P3) NIVELES DE Hg EN HÍGADO, RIÑÓN Y PLUMAS DE GAVIOTA PATIAMARILLA EN FUNCIÓN DE LA EDAD Y DEL SEXO.

Vizuete-Zorita J[1], *Hernández-Moreno D[2], López-Beceiro A[3], Fidalgo LE[3], Soler F[1], Pérez-López M[1], Míguez MP[1]*
[1]Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria (UEX). Cáceres. [2]Dpto. de Medio Ambiente. INIA. Madrid. [3]Dpto. de Ciencias Clínicas. Facultad de Veterinaria (USC). Lugo.

El interés en utilizar aves como monitores de contaminación ambiental ha aumentado, en los últimos años, siendo el mercurio más estudiado que otros metales pesados debido a su toxicidad y a su capacidad para acumularse en organismos. El objetivo del presente trabajo ha sido investigar la posible utilidad de la gaviota como bioindicador de contaminación ambiental en los ecosistemas costeros, debido a su elevada posición en la cadena trófica, su alimentación omnívora y su amplia distribución geográfica. Se han analizado los niveles de Hg mediante la técnica de ICP-MS en hígado, riñón y plumas de 107 ejemplares de gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) procedentes de Pontevedra, Coruña y Gijón, considerando la influencia de los factores endógenos sexo y edad (pollos, juveniles y adultos). Los niveles de Hg fueron 2,97±0,23, 2,14±1,96 y 1,13±0,88 µg/g en hígado, riñón y pluma respectivamente. La concentración de Hg en hígado en adultos fue 3,33±1,81 µg/g, 3,21±3,43 µg/g en juveniles y 1,75±1,40 µg/g en pollos. La concentración de Hg en riñón de adultos fue 3,14±1,77 µg/g, 3,18±2,92 µg/g en juveniles y 2,34±1,23 µg/g en pollos. Los valores obtenidos en plumas fueron

1,32±1,05, 0,87±0,53 y 1,26±0,12 µg/g en adultos, juveniles y pollos, respectivamente. Se observa que los valores más bajos de Hg en hígado y riñón aparecen en pollos, sin embargo, en plumas son los juveniles los que presentan un nivel menor. Al analizar la influencia de la edad se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas en el hígado (entre adultos y pollos, juveniles y pollos) y en el riñón (adultos y pollos). Por otro lado, al analizar la influencia del sexo solo se encontraron influencias significativas en las plumas, siendo mayor el nivel de Hg en machos que en hembras, lo que podría estar justificado por la transferencia de este metal desde la hembra al huevo.

Agradecimientos: a la Junta de Extremadura (Consejería de Economía e Infraestructuras) y a los fondos FEDER a través de las ayudas regionales a los grupos de investigación GR18 y a la Dirección Xeral de Patrimonio Natural de la Xunta de Galicia.

Palabras claves: gaviota, Hg, hígado, riñón, plumas.

TA-P4) BIOMARKERS IN MARINE POLLUTION MONITORING. COULD FISH BEING EXPOSED TO ORGANOPHOSPHORUS?

Martínez-Morcillo S [1], *Pérez-López M [1], Soler F [1], Míguez MP [1], Rodríguez-Gil JL [2], Valcárcel Y [3]*

[1] Toxicology Unit, Veterinary School, University of Extremadura, Cáceres (Spain), [2] Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 1N4 (Canada); [2]Group in Environmental Toxicology and Risk Assessment (TAyER), Rey Juan Carlos University, Madrid (Spain) [3]

Pesticides are one of the most frequently anthropogenic xenobiotics detected in water. Among these, the organophosphorus (OP) are very widely used in agricultural due to their broad spectrum of activity and their low price but has high potent effects as neurotoxic compounds also in non-target organisms. The aim of this study was to determine a set of commonly used biomarkers applied on biomonitoring in the representative Atlantic fish species *Trachurus trachurus, Merluccius merluccius* and *Trisopterus luscus* from "Rias Gallegas" as one of the most traditional Spanish fishing areas. The classical exposure biomarker which inhibition of activity has been linked with the toxic action to OP and carbamates (CB) pesticides is acetylcholinesterase (AChE) enzyme. Furthermore, through their enzymatic reactivation by addition of pyridine 2-aldoxime methiodide (2-PAM) can be differentially diagnosed OP *vs*. CB inhibition. Moreover, we selected one of the main enzymes belonging to phase II (GST) on xenobiotic-detoxifying processes. Toxic responses in terms of antioxidants defenses was analyzed through reduced glutathione (GSH) level. Malondialdehyde (MDA) as the oxidative damage biomarker of lipid peroxidation was also included in this comparative study. Significant (p<0.05) brain and muscle AChE activity reactivations on three species were reported (between 38.14 and 70.18 %). The AChE activity reactivation was positive ($r>0.8$) and significant (p<0.05) correlated with GST activity and levels of MDA. Besides, detoxifying action of GST enzyme was negative correlated ($r=-9.16$; $p=0.029$) with the antioxidant GSH level. Therefore, studied fishes might be exposed to OPs compounds. Our set of biomarker responses suggests a potential presence to hazardous substances or mixtures of chemicals in the marine environment. This battery of biomarkers may be a useful tool into the biomonitoring programs of marine pollution to assess possible environmental risk and decision-making related to fishery ecosystem management.

Acknowledgement. National project (PI14/00516) funded by Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, Regional Founds for Consolidated Research Groups from Junta de Extremadura and FEDER.

Keywords: Biomarker, biomonitoring, fish, organophosphorus

TOXICOLOGÍA EXPERIMENTAL

Comunicaciones orales

Moderadora: *Dra. Rosario Moyano Salvago.*

TE-O1) ESTUDIOS DE MUTAGENICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LA MEZCLA CILINDROSPERMOPSINA-MICROCISTINA-LR A TRAVÉS DE UNA BATERÍA DE ENSAYOS *IN VITRO*

Diez-Quijada L, *Puerto M, Prieto AI, Mellado P, Jos A, Cameán AM Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España.*

La Cilindrospermopsina (CYN) y la Microcistina-LR (MC-LR) son toxinas producidas por diferentes especies de cianobacterias que se encuentran con frecuencia en el medio ambiente. El hombre puede estar en contacto con estas cianotoxinas mediante el consumo de aguas y alimentos contaminados. Siguiendo las recomendaciones de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), es necesario realizar una batería de ensayos *in vitro* para evaluar el potencial genotóxico y/o mutagénico de sustancias presentes en alimentos, con vistas a la seguridad del consumidor. En este trabajo se evaluó el potencial mutagénico y genotóxico de la mezcla CYN/MC-LR mediante el ensayo de mutación bacteriana inversa en cinco cepas de *Salmonella typhimurium* TA97A, TA98, TA100, TA102, TA104 (Test de Ames, OECD 471), el ensayo de micronúcleos (MN, OECD 487) y el ensayo de linfoma de ratón (MLA, OECD 476) en la línea celular L5178Y Tk $^{+/-}$ y el ensayo cometa estándar y modificado en la línea celular Caco-2. Resultados preliminares del Test de Ames no mostraron actividad mutagénica de la mezcla de cianotoxinas en un rango de concentraciones de 0,125-2 µg CYN /ml y 1,25-20 µg MC-LR /ml en ausencia de S9. En el ensayo de MN realizado en un rango de concentraciones 0,084-1,35 µg CYN/ml y 0,84-13,5 µg MC-LR /ml se observó ausencia de genotoxicidad sin fracción microsómica S9. Sin embargo, se observó un aumento en la producción de MN a concentraciones elevadas en presencia de S9. En el MLA (0-0,67 µg CYN /ml y 0-6,7 µg MC-LR /ml), no se observó mutagenicidad en ausencia de S9 tras 4h de exposición. Por otro lado, tanto en la versión estándar como modificada del ensayo cometa (0,625-2,5 µg/ml CYN y 6,25-25 µg/ml MC-LR) durante 24 ó 48h de exposición, no se observó genotoxicidad ni daño oxidativo de las bases nitrogenadas de las hebras de ADN. Por tanto, de la batería empleada sólo se han obtenido resultados positivos en uno de ellos, pareciendo indicar que la genotoxicidad observada en el ensayo de MN es causada por los metabolitos de las toxinas evaluadas. Es necesario por tanto realizar más ensayos *in vitro*, siguiendo las recomendaciones de EFSA para dilucidar el potencial mutagénico y genotóxico de la mezcla CYN/MC-LR.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras clave: Genotoxicidad, Mutagenicidad, Cilindrospermopsina, Microcistina-LR, *in vitro*

TE-O2) DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN MAMÍFEROS SILVESTRES DE LA FAUNA BRASILEÑA EN EL ESTADO DE MINAS GERAIS

Soares D[1], D´Elia M[1], Lima M[1], Frade M[1], ***Gonçalves L[2],*** *Soto-Blanco B[1], Ayala N[2], Moyano MªR[2], Melo M[1]*

[1] Dpto de Clínica y Cirurgias Veterinárias - Laboratorio de Toxicologia Veterinária, Escuela de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. [2] Dpto. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense. Universidad de Córdoba. España.

El arsénico (As) es un metaloide que posee propiedades intermedias entre las de los metales y de los no metales. La mayoría de los problemas ambientales relacionados con el As están derivados de las actividades industriales (fundiciones, minería, centrales térmicas, etc.) y agrícolas (herbicidas, insecticidas, algicidas, conservadores para madera, etc.), exponiendo a todos los organismos vivos a la contaminación directa, o mediante contaminación de los alimentos. Las posibles interacciones del As con los animales silvestres brasileños son totalmente desconocidas. Brasil, debido a extensas áreas territoriales y diversos climas y microclimas, posee una gran

diversidad de fauna. Debido a la elevada población, muchos animales acaban siendo atropellados en las carreteras. Un total de once animales de diferentes especies: cuatro "gatos-do-mato-pequenos" (*Leopardus guttulus*), tres "lobos guarás" (*Chrysocyon brachyurus*), dos "tatus" (*Euphractus sexcinctus*), un "tamanduá-mirim" (*Tamandua tetradactyla*) y un "cachorro- do-mato" (*Cerdocyum thous*) fueron encontrados muertos en el estado de Minas Gerais-Brasil. Tras la realización de la necropsia en la Escuela de Veterinaria-UFMG, se tomaron muestras de hígado, riñones y estómago (cuando fue posible), procesadas y analizadas para la determinación de As mediante Absorción Atómica. En los "gatos-do- mato-pequenos", los niveles de As varían entre 0,33 a 2,13 ug/kg, con un valor medio de 1,183 ug/kg. En los "lobos guarás", el As fue de 0,58 a 2,33 ug/kg, con valor promedio de 1,222 ug/kg. Cada uno de los "tatus" presentó valores de 2,63 y 3,93 ug/kg, respectivamente. De los "cachorro-do- mato" se obtuvieron muestras de estómago con contenido, hígado y riñones, que presentaron concentraciones de 0,23; 0,34 y 1,53 ug/kg, respectivamente. Finalmente, el "tamanduá-mirim" presentó valores de 0,88 en el hígado y 14,97 ug/kg en el riñón. Los resultados revelaron bajas concentraciones en los animales, excepto en la muestra de riñón de "tamanduá-mirim". Una hipótesis para este valor más elevado de As sería la existencia de una interacción con su hábito alimenticio, ya que estos animales se alimentan de hormigas y termitas, utilizando la lengua para ello, con un estrecho contacto con el sustrato terrestre.

Palabras clave: metales, arsénico, animales silvestres, fauna brasileña

Comunicaciones tipo póster

TE-P1) ÍNDICE DE FERTILIDAD Y VIABILIDAD EMBRIONARIA DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*) COMO MODELO EN ENSAYOS DE EMBRIOTOXICIDAD

Ayala N, ***Gonçalves L,*** *Mora R, Lora AJ, Molina AM, Moyano MR*
Dpto. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense. Universidad de Córdoba. España.

La idoneidad del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental para el estudio de los disruptores endocrinos ha generalizado su uso en los laboratorios de toxicología. Además del empleo de individuos adultos en ensayos de desarrollo sexual, son frecuentes los estudios de embriotoxidad (OCDE, 2012). Para una correcta evaluación e interpretación de los resultados en este tipo de procedimientos, resulta imprescindible conocer los valores de fertilidad de los progenitores, así como la viabilidad de los embriones en condiciones laboratoriales. Los objetivos del estudio han sido evaluar la fertilidad de peces cebra en condiciones laboratoriales controladas, así como determinar la viabilidad de los embriones en función del tratamiento desinfectante aplicado tras su recolección. Se utilizaron 24 hembras y 20 machos de peces cebra, en cruces rotatorios de 6 hembras/5 machos durante tres semanas (27±1°C; 14h luz/10h oscuridad). Después de cada puesta se registraron los valores de fertilidad (embriones fertilizados/hembra). Tras la recolección, se lavaron con medios diferentes, estableciéndose tres grupos (M_1: agua de acuario de origen; M_2: agua tratada con antifúngico y antimicrobiano y M_3: solución de NaClO (3ppm)) antes de transferirlos a las placas (30 embriones/placa) para evaluar la viabilidad cada 24h hasta las 120hpf (horas post fertilización). El índice de fertilidad medio registrado fue de 40.17 embriones fertilizados/hembra. Dichos valores se incluyen dentro del rango establecido por la OECD como medio-alto (OECD 229). En relación a la viabilidad en función del tratamiento aplicado, se evidenció una marcada mortalidad embrionaria a las 24hpf en todos los casos (M_1: 74%; M_2/M_3: 52%), no incrementándose en las observaciones posteriores. Diversos autores sitúan la mortalidad embrionaria en las primeras 24hpf entorno al 40-45% (viabilidad >60%). Dicha mortalidad se correlaciona con proliferación bacteriana y fúngica, por lo que resulta fundamental el lavado y desinfección previos. El mayor número de embriones no eclosionados a las 120hpf en el M_3 (32%), evidencia un retraso manifiesto respecto a lo observado en el M_1 (26%) y M_2 (20%). Por todo ello, se determinó la idoneidad del M_2 como tratamiento previo al uso de los embriones en los ensayos de toxicidad.

Palabras clave: fertilidad, viabilidad, embriotoxicidad, disruptores endocrinos, pez cebra

TE-P2) EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL PROTEICO DE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* TRAS LA EXPOSICIÓN A CIANOBACTERIAS TÓXICAS

Diez-Quijada L[1], *de Oliveira Flávio L[2,3], Turkina VM[4], Jos A[1], Cameán AM[1], Vasconcelos V[2], Campos* A[2]
[1] Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España. [2] CIIMAR - Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, University of Porto, Portugal. [3] FCUP – Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal. [4] Division of Cell Biology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Sweden.

En la actualidad, a consecuencia del cambio climático, se está produciendo un incremento en la proliferación de biotoxinas, entre las que se encuentran la Cilindrospermopsina (CYN) y la Microcistina-LR (MC-LR), producidas por distintas especies de cianobacterias. Ambas cianotoxinas se encuentran de modo habitual en el agua, estando los organismos acuáticos como el mejillón (*Mytilus galloprovincialis)* expuestos a ellas. Una exposición continuada a estas biotoxinas puede causar alteraciones en distintas funciones biológicas, viéndose modificada la expresión de distintas proteínas. En este trabajo, se evaluó el patrón de expresión proteica de *M. galloprovincialis* alimentados con *Chrysosporum ovalisporum* (0.785 µg/mL CYN), *Microcystis aeruginosa* (2.3×10^{-3} µg/mL MC-LR), y una mezcla de ambas (CYN+MC-LR) durante 14 días de tratamiento, así como tras 14 días de depuración. Para el análisis proteómico se utilizaron las glándulas digestivas a ambos tiempos de tratamiento, utilizando la técnica "shotgun Proteomics". Tras el análisis se identificaron 799 proteínas, de las cuales 401 tenían funciones diferentes entre sí. La mezcla de CYN+MC-LR causó un incremento significativo en la expresión de 19 proteínas, 12 tras la exposición y 7 tras la depuración, observándose por tanto en este último caso una recuperación parcial en los niveles de expresión proteica. Algunas de las proteínas identificadas fueron Galectina, la subunidad ribosómica 60S y el receptor activado de Kinasa C1, las cuales participan respectivamente en procesos de respuesta inmune, síntesis proteica, traducción en eucariotas y control de calidad de los ribosomas. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas tras la exposición a las cianotoxinas individuales. Estos resultados parecen indicar por tanto la potenciación de los efectos tóxicos de CYN y MC-LR tras la exposición conjunta en *M. galloprovincialis*.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto (AGL2015-64558-R, MINECO / FEDER, UE). Leticia Diez-Quijada Jiménez también quiere agradecer su beca BES-2016-078773 asociada a dicho proyecto (MINECO / FEDER).

Palabras claves: Proteómica, Cilindrospermopsina, Microcistina-LR, *M. galloprovincialis.*

TE-P3) ESTUDIOS PREVIOS DE TOXICIDAD DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE AGARICUS BISPOROUS AQUEOUS (ABAEE) EN RATAS.

Carbonero-Aguilar P[1], Falcón-García G[1], Gallego-Yerga P[1], Velasco-Suso ME[3], del Campo JA[2], ***Moreno I [3],*** *Bautista J*
[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, España. [2] UCM Enfermedades digestivas y CIBERehd, Hospital Universitario Valme, España. [3] Área de Toxicología, Universidad de Sevilla, España.

El uso de los extractos de *Agaricus bisporus* (champiñón común) se ha extendido debido a sus beneficios para la salud, de ahí que en la actualidad se empleen como componentes de los nuevos alimentos funcionales para el tratamiento y prevención de enfermedades, más que por sus propiedades nutricionales o buen sabor. El extracto acuoso enzimático del *Agaricus bisporus* (*Ab*AEE) cumple con todos estos

requisitos de sabor, propiedades nutricionales y saludables, lo cual lo convierte en un buen candidato para su incorporación a distintas matrices para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales y nutracéuticos. Para ello sería necesario su caracterización y estudio de seguridad alimentaria. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un estudio preliminar de toxicidad aguda y subcrónica en ratas por vía oral. Para evaluar los posibles efectos adversos de *Ab*AEE a altas dosis, se utilizó el protocolo de la OCDE 423 para toxicidad aguda, incluyendo una dosis adicional de 5000 mg/Kg bw para asegurar la seguridad del extracto. Al no producirse ninguna muerte ni siquiera a la dosis más elevada, no se pudo calcular la DL50, pero sí se ha podido clasificar al *Ab*AEE en la categoría 5, sin toxicidad aguda. Tras el estudio de toxicidad oral subcrónica en ratas de *Ab*AEE (250 y 500 mg / kg b.wt/día), no se observaron alteraciones significativas en casi todos los parámetros hematológicos y bioquímicos estudiados. Estos resultados son el primer paso hacia el uso del *Ab*AEE como constituyente de nuevos alimentos funcionales/nutracéuticos. Para ello es necesario realizar más estudios tanto en animales de experimentación como en humanos, para una evaluación más profunda de la seguridad alimentaria de este extracto.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por fondos del Ministerio de Economía y Competitividad, y Fondos FEDER. (Proyecto: IPT-2011-1418-060000; Proyecto: RTC-2015-4039-2).

Palabras clave: *Agaricus bisporous*; *Ab*AEE; Toxicidad aguda; Toxicidad crónica; Ratas

TE-P4) *IN VITRO* EFFECTS OF MYCOTOXINS ON AN UNDIFFERENTIATED NEUROBLASTOMA CELL LINE

Ben-Mahmoud M[1], Mazzei G[2], ***Juan-García A[3]***
[1] Department of Biology, Private Polytechnic Superior Institute, Université Libre de Tunis. [2] Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Perugia. [3] Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia.

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by several fungi *spp*. Mycotoxins occur in cereals, fruits, spices... and tend to remain in the final product. Indeed, mycotoxins are found in processed products such as beer, breads, juices, chocolate, and wine. Different toxic strategies either by acting on the genome, targeting organs mostly kidney and liver, affecting the immune system and a major role in cancer development have been described. Some findings indicate that mycotoxins may also affect the neuronal system. The undifferentiated neuroblastoma cell line SH-SY5Y is a subclone of the SK-N-SH cell line derived from a bone marrow biopsy. It shares few proprieties with mature neurons; therefore, it is frequently used as a model to simulate the neuronal function and their differentiation. The aim of this work is to collect the studies and effects of various mycotoxin on SH-SY5Y. All articles selected address on *in vitro* cellular based assays. Aspects, mainly, studied are cells viability, ROS generation, lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential, DNA damage and, apoptotic events, among others. Cell viability has been studied by propidium iodide assay, MTT assay, neutral red assay, lactate dehydrogenase leakage assay or reduction of the total cellular protein concentration. ROS generation has been studied by DCFH-DA, dihydroethidium or red mitochondrial superoxide indicator. Lipid peroxidation has been studied by MDA determination. Mitochondrial membrane potential by rhodamine 123 or TMRM. DNA damage by COMET assay. Caspase activation by Western Blotting or N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin. Despite all studies performed for investigating mycotoxins effect at neuronal level, there is still a lack of knowledge in the effects at long-term exposure and their possible implications in developing neurological diseases.

Keywords: mycotoxins, SH-SY5Y cells, neurotoxicity, *in vitro*
Acknowledgements: This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2016-77610-R).

TE-P5) EVALUACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD EN PECES MEDIANTE EL CONTROL DE LA ESTABILIDAD DEL MEDIO ACUÁTICO

Ayala N, ***Mora R,*** *Gonçalves L, Lora AJ, Molina AM, Moyano MR*
Dpto. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense. Universidad de Córdoba. España.

Los peces son biomodelos comúnmente utilizados en Toxicología. Los diferentes estudios, así como las recomendaciones para su realización se incluyen en el Documento de Referencia de ensayos de toxicidad en peces (OCDE, 2012). Sin embargo, son escasos los estudios especializados y completos acerca de la calidad de agua para su manejo laboratorial. Este estudio pretende evidenciar la estabilidad del medio en relación a los parámetros de calidad del agua en un sistema cerrado de mantenimiento de peces a nivel laboratorial con el objetivo de garantizar tanto el bienestar de los animales, como la reproducibilidad de los ensayos de toxicidad. El sistema de mantenimiento seleccionado en estudios previos estaba compuesto por cuatro acuarios de 25L y un acuario de 75L para reposición de agua. Se realizaron dos renovaciones semanales del 25% con la adición del 10% de agua destilada. La medición de pH, temperatura y conductividad se realizó diariamente. Por otro lado, la dureza y alcalinidad, así como amonio, nitritos y nitratos se evaluó semanalmente. Hubo dos periodos bien definidos: dos meses iniciales de estandarización de la calidad del agua sin animales y un mes posterior de evaluación del medio con animales (1 pez/L). Los valores medios durante el primer y segundo periodo fueron: 7.98/7.47* para el pH; 32.5/35.2µS/cm* para la conductividad; 110.3/115.7ppm para la dureza; 87.9/80.1ppm para la alcalinidad y 1.41/13.13mg/L* para los nitratos. Amonio y nitritos presentaron niveles cercanos a cero en ambas fases (*diferencias estadísticamente significativas). Los resultados evidencian un incremento de la acidez derivado de los procesos biológicos, así como un incremento esperable de la conductividad y de los nitratos del agua asociado a la presencia de animales, permitiendo un margen amplio de fluctuaciones dentro de los límites aceptables y asegurando el bienestar animal y por tanto la fiabilidad y reproducibilidad de los ensayos de toxicidad.

Palabras clave: bienestar animal, reproducibilidad, toxicidad, pez cebra, validación.

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGIA

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Los manuscritos, **en español o inglés**, se someterán por el editor a dos expertos que actuarán como revisores externos a la revista, cuyas observaciones se trasladarán al autor para la reescritura del original en caso de ser aceptados.

El texto debe ser claro y conciso, cuidando la ortografía y la utilización de abreviaturas (SI). Tanto la forma como el contenido deberán ser cuidadosamente revisados antes de su envío. Se utilizará **interlineado a doble espacio, letra tipo Times New Roman de 12 puntos, sin sangrías en los párrafos, con justificación completa**, con márgenes amplios, en tamaño DIN A4, preferiblemente en archivo Word. Todas las páginas irán numeradas correlativamente.

Manuscritos en **español**: Título, Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es, Institución/es, Resumen, Palabras Clave, Title, Abstract, Key Words, Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Bibliografía, Tablas, Leyendas de las Figuras.

Manuscritos en **inglés**: Title, Family name/s and First name/s initial/s, Abstract, Key Words, Título, Resumen, Palabras Clave, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Leyends of figures.

El manuscrito se estructura, por tanto, en los siguientes apartados (por favor, no use mayúsculas más que en la primera letra del título y apartados):

Título descriptivo del artículo (no en mayúsculas) y **Title**, además de una versión corta del título.

Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es.

Institución/es donde se ha realizado el trabajo, distinguiéndolas con numerales en superíndice. Marcar con un asterisco el autor de contacto e incluir su correo electrónico, teléfono y fax.

Resumen y Abstract. Las versiones en español e inglés serán lo más informativas posible, en un solo párrafo, con una pequeña introducción, la identificación de los métodos, los resultados abreviados y particularmente las conclusiones del trabajo. Su lectura dará una idea clara del mismo. Ninguno debe sobrepasar las **250** palabras ni incluir abreviaturas, referencias o tablas.

Palabras Clave y Key Words tras cada resumen, con hasta cinco palabras separadas por punto y coma.

Introducción: descripción de los orígenes y bases del estudio.

Material y Métodos. Se evitarán descripciones de todo aquello que pueda encontrarse en la bibliografía citada. Deben describirse de forma concisa los individuos y series estudiados, criterios de selección, procedimientos, duración y número de repeticiones de los ensayos, equipo y materiales utilizados y cuantos datos puedan precisarse para la repetición del estudio. Deben especificarse las técnicas analíticas y los métodos estadísticos. Para sustancias químicas o fármacos se citará el nombre genérico conforme a la IUPAC. Si se utiliza una marca registrada, se hará constar el nombre genérico y el nombre del fabricante.

Resultados. Se presentarán las observaciones realizadas, sin interpretarlas, así como el análisis estadístico. Los datos numéricos se pueden presentar en tablas o figuras, pero sin repetirlos entonces en el texto.

Discusión: en ella se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, las razones que apoyan la validez de los mismos, su aplicación práctica y las directrices para nuevas investigaciones.

**Los apartados de resultados y discusión pueden redactarse conjuntamente.*

Conclusiones. Breves obtenidas directamente del trabajo.

Agradecimientos. Si fueran necesarios, particularmente a las entidades financiadoras.

Bibliografía. La exactitud de las referencias bibliográficas es responsabilidad de los autores. Sólo deberían incluirse referencias relacionadas estrechamente con el trabajo. Todas las referencias listadas deben ir citadas en el texto.

Las referencias bibiográficas se referencian en el texto con el apellido del autor y año de publicación si el autor de la obra es uno solo (Font, 2005). En caso de ser dos los autores de la publicación se citarán los apellidos de ambos (Font y Ruiz, 2009). Si son tres o más los autores se pondrá el apellido del primer autor et al., año (Tolosa et al., 2013). Las referencias a distintos trabajos en una misma cita se separan con punto y coma y son ordenadas cronológicamente: (Rodriguez et al., 2012; Serrano et al., 2013). Si existieran varias referencias de un autor/es o autora/s en un mismo año se consignarán con las letras a, b, c, etc., después del año.

En el apartado de bibliografía se recogen todas las referencias por orden alfabético y del modo indicado a continuación. La bibliografía irá citada de la siguiente forma:

1. Artículos de revistas.-

Estructura general: Autor/es. Título del artículo. Abreviatura internacional de la revista. Año; volumen (número), página inicial-final del artículo.

Ejemplo: *Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E.* Presencia de micotoxinas Fusarium en pescado de acuicultura. Rev. Toxicol. 2013; 30 (2), 193-197.

2. Libros y otras monografías.-

Estructura general: Autor/es.Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. La primera edición no es necesario consignarla. La edición siempre se pone en números arábigos y abreviatura: 2ª ed. Si la obra estuviera compuesta por más de un volumen, debemos citarlo a continuación del título del libro: Vol. 3.

-Capítulo de libro.

Autor/es del capítulo. Título del capítulo. En: Director/Coordinador/Editor del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial-final del capítulo.

Ejemplo: Cameán AM, Repetto M. Introducción y conceptos. En Cameán AM, Repetto, M. (Eds.), Toxicología alimentaria. Díaz De Santos, Madrid, España. 2006. p.1-18.

-Comunicación presentada a un congreso.

Autor/es de la Comunicación/Ponencia. Título de la Comunicación/Ponencia. Título oficial del Congreso. Publicación. Editorial; año. Página inicial-final de la comunicación/ponencia.

Ejemplo: Saladino, F., López, M., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., Meca, G. El uso de antimicrobianos naturales para el aumento de la vida útil del pan de molde. XXICongreso Español y V Iberoamericano de Toxicología. Rev. Toxicol. 32 (1). Asociación Española de Toxicología; 2015, p32.

3. Material electrónico.- Artículo de revista en Internet.

Autor/es del artículo. Título del artículo. Nombre de la revista [revista en Internet] año [fecha de consulta]; volumen (número): [Extensión/páginas]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Francés I, Barandiarán M, Marcellán T, Moreno L. Estimulación psicocognoscitiva en las demencias. An Sist Sanit Navar [revista en Internet] 2003 septiembre-diciembre. [Acceso 19 de octubre de 2005]; 26(3). Disponible en: http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/n3/revis2a.html

-Monografía en Internet.

Autor/es o Director/Coordinador/Editor. Título [monografía en Internet]. Edición. Lugar de publicación: Editor; año [fecha de consulta]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Moraga Llop FA. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Dermatología Pediátrica. [Monografía en Internet]. Madrid: Asociación Española de Pediatría; 2003 [acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: http://www.aeped.es/protocolos/dermatologia/index.htm

-Sede Web o Página principal de inicio de un sitio Web.

Autor/es. Título [sede Web]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización; fecha de acceso]. Dirección electrónica. -

Ejemplo: Fisterra.com, Atención Primaria en la Red [sede Web]. La Coruña: Fisterra.com; 1990- [actualizada el 3 de enero de 2006; acceso 12 de enero de 2006]. Disponible en:http://www.fisterra.com

-Parte de una página de un sitio o sede Web. -

Título de la página [sede Web]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización/revisión; fecha de acceso]. Título de la sección [número de páginas o pantallas]. Dirección electrónica.

Ejemplo: American Medical Association [sede Web]. Chicago: The Association; c1995- 2002 [actualizado 5 de diciembre de 2005; acceso 19 de diciembre de 2005]. AMA Office of Group Practice Liaison; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html. -

–Base de datos en Internet.

Institución/Autor. Título [base de datos en Internet]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de creación, [fecha de actualización; fecha de consulta]. Dirección electrónica. -

Ejemplo: PubMed [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 1966- [fecha de acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

-Parte de una base de datos en Internet. MeSH Browser [base de datos en Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 [acceso 19 de diciembre de 2005]. Meta-analysis; unique ID D015201 [aproximadamente 3 pantallas]. Disponible en: http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html. Ficheros actualizados semanalmente.

Para otras situaciones no recogidas en este texto se puede consultar la siguiente dirección
http://www.fisterra.com/herramientas/recursos/vancouver/#ejemplos

Tablas

- Deben ser tan claras y simples como sea posible.
- Las tablas se incluyen **tras la bibliografía**, en el documento principal del manuscrito, en páginas independientes, numeradas correlativamente (1, 2…).
- Los títulos deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin consultar el texto.
- La información adicional puede incluirse como nota al pie de tabla o figura.
- Las tablas debieran ser lo suficientemente cortas para evitar dividirlas.

Figuras

Los pies de las figuras se incluyen en el documento principal del manuscrito, tras las tablas, numerados consecutivamente (1, 2…) y deben ser lo suficientemente descriptivos como para hacerlos comprensibles sin necesidad de consultar el texto.

Las figuras propiamente dichas se envían **comprimidas en formato WinZip**. Las imágenes se enviarán digitalizadas, preferiblemente en formato TIFF, JPEG o PNG de al menos 300 p.p.p.de resolución (pero no mucho más) para el tamaño final.

Dado que actualmente la revista únicamente se edita en versión digital, las figuras deberán enviarse en color. Los símbolos identificadores preferidos en las figuras son círculo, cuadrado y triángulo abiertos o llenos.

Las figuras deben tener suficiente calidad. **No contendrán los títulos ni referencia a su número ni tendrán innecesariamente espacio en blanco alrededor**.

Las señales y leyendas se pueden incluir dentro de los ejes de la figura.

Las figuras publicadas previamente deben contar con el permiso escrito del titular de los derechos.

La redacción de la revista se reserva el derecho de introducir modificaciones en los artículos recibidos, siempre que no alteren el sentido de los mismos, para adaptarlos al estilo de la revista.

Los trabajos se enviarán a través de la plataforma de la revista: **http://rev.aetox.es/wp/index.php/envio-articulo/**

El Equipo Editorial: revista@aetox.es

Editora:
Dra. Guillermina Font Pérez. Universitat de València.
Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal.
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Valencia

Editoras adjuntas:
Dra. Emilia Ferrer García. Universitat de València
Dra. María P. Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura
Dr. Juan Carlos Rios Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 35 (1), 1 – 82 (2018)
ISSN 0212-7113

Calidad de Revistas Científicas Españolas FECYT | FUNDACIÓN ESPAÑOLA PARA LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA | 2016

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, REDIB, IBECS, ICYT, Index Copernicus, IME, Recolecta, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Asociación Española de Toxicología

Presidenta: Dra. Ana Cameán Fernández
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

Vicepresidenta: Dra. Mª José Ruiz Leal
Facultat de Farmàcia. Universitat de València.

Secretaria: Dra. Emma Martínez López.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Tesorera: Dra. Ángeles Jos Gallego.
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Internet: http://aetox.es

Sección de Educación en Toxicología

Dra. Mónica Fernández Franzón
Universitat de València. Valencia

Sección de Toxicología Clínica

Dra. Ana Isabel Morales.
Universidad de Salamanca. Salamanca

Sección de Métodos Alternativos

Dr. Rafael Balaña
Universidad de León. Leon

Sección de Toxicología Experimental

Dra. Rosario Moyano Salvago
Universidad de Córdoba. Córdoba

Sección de Seguridad Alimentaria

Dra. Silvia Pichardo Sánchez
Universidad de Sevilla. Sevilla.

Sección de Toxicología forense

Dra. Ana Maria Bermejo.
Universidad de Santiago de Compostela. La Coruña

Sección de Toxicología Ambiental

Dr. Fernando Gil.
Universidad de Granada. Granada

Sección de Toxicología Veterinaria

Dr. Francisco Soler Rodríguez
Universidad de Extremadura. Cáceres

Revista de Toxicología (Editada desde 1983)

Editora:
Dra. Guillermina Font Pérez.
Universitat de València. Valencia

E-mail equipo Editorial: revista@aetox.es

Editores adjuntos:
Dra. Emilia Ferrer García.
Universitat de València. Valencia

Dra. María P. Míguez Santiyán.
Universidad de Extremadura. Cáceres

Dr. Juan Carlos Rios Bustamante
Pontificia Universidad Católica de Chile