Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 32 Número 2 (2015) **SEMESTRAL**

INDEX

Editorial. 89
Frutos Pérez-Surio A, Sabroso González MC **Teaching toxicological risk assessment in academia: TRISK-or-treat?**.....89-94
Tschambler JA, Wierna NR, Romero AE, Rios FT, Ruggeri MA, Bovi Mitre MG. **Blood lead levels in children exposed to metallurgic residues in Abra Pampa, Jujuy (Argentina)**.....95-97
Vázquez Lima M J, Álvarez Rodríguez C , Cruz Landeira A, López Rivadulla M. **Unnoticed intoxication of carbon monoxide: an hidden epidemia**. 98-101
López K, Pinedo C and Zambrano M. **Labor safety practices and levels of serum biomarkers in pesticide users on rice crops in Natagaima-Tolima, Colombia**.....102-106
Gordillo MA, Gomez RL, Navarro AR, Maldonado MC. **Ecotoxicity studies of antifungal metabolites of *Bacillus* sp. IBA 33**……..….107-111
Jaramillo-Colorado BE, Duarte-Restrepo E, Pino-Benítez Nayive. **Evaluation of repellent activity of essential oils obtained from *Piperacea* plants from Choco department,Colombia**.....112-116
Cerda P., Silva L., Gutiérrez W., Mieres JJ, París E., Ríos J.C. **Veterinary intoxication in Chile reported to Toxicological Information Centre from Pontifical University Catholic of Chile (CITUC)** ……..….117-120
Astudillo Alemán AL, Ramírez Orellana MI, García Alvear NB, González Arévalo GJ, Gutiérrez Valle IA, Bailón Moscoso NC. **Chemical characterization of particulate material (PM_{10}) from the urban area of Cuenca –Ecuador and investigation of its genotoxicity and oxidative stress induction in alveolar epithelial cells A549**.....121-126
Bustamante JJ, Chaparro AL, Peláez MJ. **Anthropic activity impact derived from petroleum industry and related to presence of heavy metals in Colombian bovine livestock**.....127-130
García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E. **Comparison of different cooking processes of fresh pasta and content of emerging mycotoxins** ……131-134
Alfonso M., Faro L.R.F., Oliveira I.M., Duran R. **Glutamate antagonist, NOS inhibitor and antioxidants with SH-groups mediate in releasing striatal dopamine, induced by clothianidin** ……..……...135-139
Pérez Donato J.A., Vera L., Bravo Sánchez L.R., Delgado Díaz S., González Cabrera E. **Physicochemical and phytotoxic evaluation of refined sewage water for agricultural irrigation** 140-143
Juan-García A., Gallego C., Font G. **Toxicity of Bisphenol A: A review** 144-160
Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2015 161-171

ÍNDICE

Editorial. 89
Frutos Pérez-Surio A, Sabroso González MC **Enseñanza de la evaluación del riesgo toxicológico en un entorno académico: ¿TRISK or treat?**..... 89-94
Tschambler JA, Wierna NR, Romero AE, Rios FT, Ruggeri MA, Bovi Mitre MG. **Niveles de plomo en sangre de niños expuestos a los residuos metalúrgicos en Abra Pampa, Jujuy (Argentina)**.....95-97
Vázquez Lima M J, Álvarez Rodríguez C , Cruz Landeira A, López Rivadulla M. **Intoxicaciones inadvertidas por monóxido de carbono: una epidemia oculta**. 98-101
López K, Pinedo C and Zambrano M. **Prácticas de Salud Ocupacional y niveles de biomarcadores séricos en aplicadores de plaguicidas de cultivos de arroz en Natagaima-Tolima, Colombia**.....102-106
Gordillo MA, Gomez RL, Navarro AR, Maldonado MC. **Estudios de la ecotoxicidad de metabolitos antifúngicos de Bacillus sp. IBA 33**….107-111
Jaramillo-Colorado BE, Duarte-Restrepo E, Pino-Benítez Nayive. **Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó, Colombia**……..…112-116
Cerda P., Silva L., Gutiérrez W., Mieres JJ, París E., Ríos J.C. **Intoxicaciones veterinarias en Chile reportadas al Centro de Información Toxicológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC)** ……117-120
Astudillo Alemán AL, Ramírez Orellana MI, García Alvear NB, González Arévalo GJ, Gutiérrez Valle IA, Bailón Moscoso NC. **Caracterización química del material particulado (PM_{10}) de la zona urbana de Cuenca-Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549**……..…121-126
Bustamante JJ, Chaparro AL, Peláez MJ. **Impacto de las actividades antrópicas derivadas de la industria petrolera en relación con la presencia de metales pesados en la ganadería bovina colombiana**……...……127-130
García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E. **Comparación del efecto de diferentes tipos de cocción de la pasta fresca en el contenido de micotoxinas emergentes**……..……131-134
Alfonso M., Faro L.R.F., Oliveira I.M., Duran R. **Mediación de un antagonista del glutamato, un inhibidor de la NOS y antioxidantes con grupos SH en la liberación de dopamina estriatal inducida por clotianidina** ……..……...……135-139
Pérez Donato J.A., Vera L., Bravo Sánchez L.R., Delgado Díaz S., González Cabrera E. **Valoración físico - química y fitotóxica de las aguas residuales depuradas/regeneradas destinadas al riego agrícola** ……..……..140-143
Juan-García A., Gallego C., Font G. **Toxicidad del Bisfenol A: Revisión** ……..…….144-160
Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2015…..161-171

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

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 32 (2), 88-171 (2015)
ISSN 0212-7113

REDIB
http://aetox.es

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, aunque periódicamente publique una selección de artículos en papel, que está 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://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:
Emilia Ferrer García. Universitat de València
María P. Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura

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 32 Número 2 (2015) **SEMESTRAL**

INDEX

Editorial. 89
Frutos Pérez-Surio A, Sabroso González MC **Teaching toxicological risk assessment in academia: TRISK-or-treat?**.....89-94
Tschambler JA, Wierna NR, Romero AE, Rios FT, Ruggeri MA, Bovi Mitre MG. **Blood lead levels in children exposed to metallurgic residues in Abra Pampa, Jujuy (Argentina)**.....95-97
Vázquez Lima M J, Álvarez Rodríguez C , Cruz Landeira A, López Rivadulla M. **Unnoticed intoxication of carbon monoxide: an hidden epidemia**. 98-101
López K, Pinedo C and Zambrano M. **Labor safety practices and levels of serum biomarkers in pesticide users on rice crops in Natagaima-Tolima, Colombia**.....102-106
Gordillo MA, Gomez RL, Navarro AR, Maldonado MC. **Ecotoxicity studies of antifungal metabolites of B*acillus* sp. IBA 33**……..…..107-111
Jaramillo-Colorado BE, Duarte-Restrepo E, Pino-Benítez Nayive. **Evaluation of repellent activity of essential oils obtained from *Piperacea* plants from Choco department,Colombia**.....112-116
Cerda P., Silva L., Gutiérrez W., Mieres JJ, París E., Ríos J.C. **Veterinary intoxication in Chile reported to Toxicological Information Centre from Pontifical University Catholic of Chile (CITUC)** ……..…117-120
Astudillo Alemán AL, Ramírez Orellana MI, García Alvear NB, González Arévalo GJ, Gutiérrez Valle IA, Bailón Moscoso NC. **Chemical characterization of particulate material (PM_{10}) from the urban area of Cuenca –Ecuador and investigation of its genotoxicity and oxidative stress induction in alveolar epithelial cells A549**.....121-126
Bustamante JJ, Chaparro AL, Peláez MJ. **Anthropic activity impact derived from petroleum industry and related to presence of heavy metals in Colombian bovine livestock**.....127-130
García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E. **Comparison of different cooking processes of fresh pasta and content of emerging mycotoxins** ……131-134
Alfonso M., Faro L.R.F., Oliveira I.M., Duran R. **Glutamate antagonist, NOS inhibitor and antioxidants with SH-groups mediate in releasing striatal dopamine, induced by clothianidin** ……..……...135-139
Pérez Donato J.A., Vera L., Bravo Sánchez L.R., Delgado Díaz S., González Cabrera E. **Physicochemical and phytotoxic evaluation of refined sewage water for agricultural irrigation** 140-143
Juan-García A., Gallego C., Font G. **Toxicity of Bisphenol A: A review** 144-160
Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2015 161-171

ÍNDICE

Editorial. 89
Frutos Pérez-Surio A, Sabroso González MC **Enseñanza de la evaluación del riesgo toxicológico en un entorno académico: ¿TRISK or treat?**..... 89-94
Tschambler JA, Wierna NR, Romero AE, Rios FT, Ruggeri MA, Bovi Mitre MG. **Niveles de plomo en sangre de niños expuestos a los residuos metalúrgicos en Abra Pampa, Jujuy (Argentina)**.....95-97
Vázquez Lima M J, Álvarez Rodríguez C , Cruz Landeira A, López Rivadulla M. **Intoxicaciones inadvertidas por monóxido de carbono: una epidemia oculta**. 98-101
López K, Pinedo C and Zambrano M. **Prácticas de Salud Ocupacional y niveles de biomarcadores séricos en aplicadores de plaguicidas de cultivos de arroz en Natagaima-Tolima, Colombia**.....102-106
Gordillo MA, Gomez RL, Navarro AR, Maldonado MC. **Estudios de la ecotoxicidad de metabolitos antifúngicos de Bacillus sp. IBA 33**….107-111
Jaramillo-Colorado BE, Duarte-Restrepo E, Pino-Benítez Nayive. **Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó, Colombia**……..…112-116
Cerda P., Silva L., Gutiérrez W., Mieres JJ, París E., Ríos J.C. **Intoxicaciones veterinarias en Chile reportadas al Centro de Información Toxicológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC)** ……117-120
Astudillo Alemán AL, Ramírez Orellana MI, García Alvear NB, González Arévalo GJ, Gutiérrez Valle IA, Bailón Moscoso NC. **Caracterización química del material particulado (PM_{10}) de la zona urbana de Cuenca-Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549**……121-126
Bustamante JJ, Chaparro AL, Peláez MJ. **Impacto de las actividades antrópicas derivadas de la industria petrolera en relación con la presencia de metales pesados en la ganadería bovina colombiana**……...……127-130
García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E. **Comparación del efecto de diferentes tipos de cocción de la pasta fresca en el contenido de micotoxinas emergentes**……..……131-134
Alfonso M., Faro L.R.F., Oliveira I.M., Duran R. **Mediación de un antagonista del glutamato, un inhibidor de la NOS y antioxidantes con grupos SH en la liberación de dopamina estriatal inducida por clotianidina** ……..……...……135-139
Pérez Donato J.A., Vera L., Bravo Sánchez L.R., Delgado Díaz S., González Cabrera E. **Valoración físico - química y fitotóxica de las aguas residuales depuradas/regeneradas destinadas al riego agrícola** ……..……..140-143
Juan-García A., Gallego C., Font G. **Toxicidad del Bisfenol A: Revisión** ……..144-160
Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2015…..161-171

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 32 (2), 88-171 (2015)
ISSN 0212-7113

REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico

http://aetox.es

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ DE REDACCIÓN

Editora
Dra. GUILLERMINA FONT PÉREZ
Universitat de València. VALENCIA
E-mail: Guillermina.font@uv.es

Editoras Adjuntas
Dra. EMILIA FERRER GARCÍA
Universitat de València. VALENCIA
E-mail: Emilia.ferrer@uv.es

Dra. Mª DEL PRADO MÍGUEZ SANTIYÁN
Universidad de Extremadura. CÁCERES
E-mail: mpmiguez@unex.es

Comité Editorial
Dr. RAFAEL BALAÑA FAUCE
Universidad de León. LEÓN
E-mail: rbalf@unileon.es

Dra. HOUDA BERRADA RAMDAMI
Universitat de València. VALENCIA
E-mail: houda.berrada@uv.es

Dr. ANGEL TOMÁS CAMACHO GARCÍA
Laboratorios Lema & Bandín. VIGO
E-mail: atcamacho@lemabandin.com

Dra. ANA MARÍA CAMEÁN FERNÁNDEZ
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: camean@us.es

Dr. ANTONIO JUAN GARCÍA FERNÁNDEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: ajgf@um.es

Dr. FERNANDO GIL HERNÁNDEZ
Universidad de Granada. GRANADA
E-mail: fgil@ugr.es

Dr. DIEGO GONZÁLEZ MACHÍN
CEPIS/OPS. LIMA (PERÚ)
E-mail: dgonzale@cepis.ops-oms.org

Dr. CARLOS GOTELLI
Centro de Investigaciones Toxicológicas BUENOS AIRES (ARGENTINA)
E-mail: dgotelli@impsatl.com.ar

Dr. ARTURO HARDISSON DE LA TORRE
Universidad de La Laguna. TENERIFE
E-mail: atorre@ull.es

Dra. ÁNGELES JOS GALLEGO
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: angelesjos@us.es

Dra. Mª ARÁNZAZU MARTÍNEZ CABALLERO
Universidad Complutense de Madrid. MADRID
E-mail: arantxam@vet.ucm.es

Dra. EMMA MARTÍNEZ LÓPEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: emmaml@um.es

Dra. ROSARIO MOYANO SALVAGO
Universidad de Córdoba. CÓRDOBA
E-mail: r.*moyano*@uco.es

Dr. JUAN CARLOS RÍOS BUSTAMANTE
Pontificia Universidad Católica. CHILE
E-mail: jcrios@MED.PUC.CL

Dr. JOSÉ RUEFF
Universidad Libre de Lisboa.
LISBOA (PORTUGAL)
E-mail: rueff.gene@fcm.unl.pt

Dra. MARÍA JOSÉ RUIZ LEAL
Universitat de València. VALENCIA
E-mail: m.jose.ruiz@uv.es

Dra. MARÍA LUISA SORIA SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. SEVILLA
E-mail: luisa.soria@mju.es

Dra. MARÍA JESÚS TABERNERO DUQUE
Universidad de Santiago de Compostela. LA CORUÑA
E-mail: mj.tabernero@usc.es

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

Revista de Toxicología

EDITORIAL

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, aunque periódicamente publique una selección de artículos en papel, que está diseñada para facilitar la divulgación de la investigación actual en el campo de la Toxicología. Por su carácter electrónico y su estructura organizativa pretende acortar los tiempos de publicación científica, proporcionando un sistema de referencia actualizado de su campo de estudio. La revista refleja su carácter multidisciplinar tanto en los contenidos como en la composición del Comité Editorial.

El equipo editorial anima a los autores a aprovechar todas las potencialidades del medio electrónico ya que se trata de un formato especialmente apto para la representación visual que permite utilizar el color y los recursos interactivos.

Cada año se editarán dos números, en junio y en diciembre, con un mínimo de 10 artículos cada uno. Cada artículo publicado tendrá que obtener una evaluación favorable de dos evaluadores.

El equipo quiere agradecer al Dr. Guillermo Repetto y a la Dra. María José González el trabajo realizado ya que en SCOPUS la Revista de Toxicología presenta en 2014 un valor de 0,312 según el índice de impacto SNIP (Source Normalized Impact per Paper) lo que sitúa a la revista en el tercer quartil (Q3) del área de “Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics”.

Ánimo esperamos vuestras publicaciones.

Equipo Editorial

Rev. Toxicol (2015) 32: 89-94

Enseñanza de la evaluación del riesgo toxicológico en un entorno académico: ¿TRISK or treat?

Frutos Pérez-Surio A1, Sabroso González MC2

1. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza
2. Licenciada en Ciencias Químicas. Técnico en Prevención de Riesgos Laborales. Consultora Medioambiental

Resumen: El proyecto europeo de formación sobre Evaluación de Riesgos Toxicológicos (TRISK), co-financiado por el Programa de acción comunitario en el ámbito de la salud (2008-2013) de la Comisión Europea, puede servir como base para las clases en un ambiente académico. En la Universidad de Zaragoza, Toxicología Ambiental y Salud Pública es la única asignatura relacionada con la salud del Grado en Ciencias Ambientales. La evaluación de riesgos es una de las principales competencias que los estudiantes deben adquirir a lo largo de este Grado. Este artículo revisa el estado actual del conocimiento sobre la evaluación del riesgo toxicológico en el ámbito académico. El objetivo general es mejorar la enseñanza de la evaluación del riesgo toxicológico. Los objetivos específicos son: comparar los conceptos académicos con los utilizados en TRISK como patrón de referencia, y comparar las definiciones de los estudiantes con los conceptos académicos. Se realizó un estudio descriptivo transversal en la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Zaragoza a lo largo del primer semestre de 2014. El registro y análisis de los datos se realizó con hoja de cálculo Excel. Se muestran los resultados de los conceptos de evaluación de riesgos toxicológicos adquiridos por los estudiantes, en comparación con TRISK y otras normas. Los resultados demuestran lo importante que es mejorar la transferencia de conocimiento en el entorno académico. El estudio puede ser un punto de partida para la puesta en práctica y refuerza la importancia y necesidad de la evaluación de riesgos, así como el impacto y las contribuciones de esta disciplina a nivel local.

Palabras clave: Evaluación de riesgo toxicológico; programa TRISK; toxicología ambiental y salud pública; enseñanza; educación.

Abstract: **Teaching toxicological risk assessment in academic setting: TRISK-or-treat?**

European Toxicology Risk Assessment Training Programme (TRISK), co-financed by the European Commission Second Programme of Community Action in the field of Health (2008-2013), can serve as basis for classes in academic setting. In the University of Zaragoza, Environmental Toxicology and Public Health is the only subject of Degree in Environmental Sciences related to health. Risk assessment is one of main competences that students should acquire along this Degree. This manuscript performs a mini-review of toxicological risk assessment state-of-the-art in academic setting.The general objective is to improve teaching toxicological risk assessment. Specific objectives are: To compare academic concepts with TRISK gold standard and to compare student definitions with academic concepts.A descriptive cross-sectional study was made in Technological College, University of Zaragoza along first semester of 2014. Data registration and analysis was performed with Excel spreadsheet.Here we show the results of toxicological risk assessment concepts acquired by students, compared with TRISK and other standards. Our results demonstrate how important is to improve knowledge transfer in academic setting. We anticipate our study to be a starting point for the implementation and reinforce the importance and need of risk assessors, as well as the impact and contributions of this discipline at the local level.

Keywords: Toxicological risk assessment, TRISK programme, environmental toxicology and public health, teaching, education.

*e-mail: ajfrutos@unizar.es

Introducción

El Proyecto europeo de formación sobre Evaluación de Riesgos Toxicológicos (TRISK, por sus siglas en inglés) fue co-financiado por la Comisión Europea en el Segundo Programa de acción comunitaria en el ámbito de la salud (2008-2013) [ ] como una acción prioritaria encaminada a mejorar la seguridad de los ciudadanos. TRISK implementa el diseño operativo adaptado desde las Guías del Programa de Formación Avanzada en la Evaluación de Riesgos para la Salud Humana de las Sustancias Químicas (RAAP, por sus siglas en inglés): proporciona un amplio programa de capacitación sobre los conceptos fundamentales de evaluación de riesgos y procesos que sirven de modelo para la formación europea futura en la evaluación de riesgos y para la certificación de los evaluadores de riesgos europeos. TRISK constaba de tres elementos: 1) Un programa modular, que incluye ocho módulos de cursos de una semana de duración; 2) un periodo de formación aplicada de 450 horas en una institución donde realizar evaluaciones de riesgos; y 3) un examen final. La descripción de los módulos se muestra en la tabla 1. En la Universidad de Zaragoza, la asignatura de Toxicología Ambiental y Salud Pública es la única relacionada con el ámbito de la salud del Grado en Ciencias Ambientales [ ]. El Grado abarca cuatro años (ver tabla 2), con un total de 240 créditos ECTS. El plan de estudios se estructura en cuatro módulos que garanticen la adquisición de ciertas habilidades, entre las que se encuentra la evaluación del riesgo toxicológico, como parte del proceso de análisis de riesgo (figura 1).

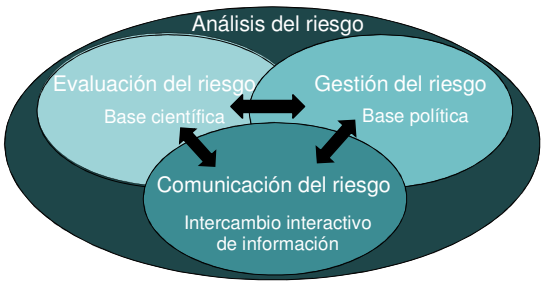


Figura 1. Proceso de análisis del riesgo

Entre las clases de teoría, se les enseña las fases y técnicas de evaluación de riesgos toxicológicos [i]. Para reforzar la información dada, y para mejorar el conocimiento de los estudiantes, la enseñanza práctica se programa a través del aprendizaje basado en problemas específicos: la formulación de preguntas, el diseño, la causalidad, el uso de instrumentos (epidemiología, toxicocinética y toxicodinamia, fisiología, conocimiento del medio,…), el uso de modelos animales, la difusión de los datos y la vinculación a la investigación de mercado. Ejemplos de otras fuentes de información relacionadas con la evaluación del riesgo toxicológico son el Programa Internacional sobre Seguridad Química [ii] y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [iii]. A través del Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS), se establecen las bases científicas para la gestión racional de los productos químicos, y se fortalece la capacitación sobre la seguridad química. La seguridad química se logra mediante la realización de todas las actividades que involucran productos químicos de una manera tal que se garantice la seguridad de la salud humana y el medio ambiente. Cubre todos los productos químicos, naturales y fabricados, y toda la gama de situaciones de

Tabla 1. *Descripción de los módulos del proyecto TRISK.*

MÓDULO 1: Introducción a la evaluación y gestión de riesgos, con especial atención a la evaluación del riesgo químico
a. ¿Cuál es la evaluación de riesgos?
b. Finalidad de la evaluación de riesgos
c. Los marcos regulatorios, incluyendo la clasificación y el etiquetado
d. La percepción del riesgo, la comunicación de riesgos y gestión de riesgos
e. GLP y control de calidad
f. Guías de estudio
MÓDULO 2: Papel de ADME en la evaluación de riesgos
a. Los modelos matemáticos
b. La especificidad de especie
c. Dosis transición
d. Ejemplos de PBPK
e. El uso de los datos in vitro y métodos alternativos
MÓDULO 3: Identificación y evaluación de los carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos
a. Relación dosis-respuesta (definición de NOAEL y/o BMD)
b. Modo de acción y la relevancia humana de los efectos tóxicos (por ejemplo, marco IPCS)
c. La extrapolación a los seres humanos, incluyendo subpoblaciones sensibles
d. Factores de ajustes específicos de la sustancia/preparado
e. Extrapolación vía a vía
MÓDULO 4: Evaluación de la exposición en la evaluación del riesgo
a. Determinístico y probabilístico
b. Agregado y acumulado
c. Ambiental y biomarcadores
d. Modelización
MÓDULO 5: Identificación y evaluación de la toxicidad en órganos, incluyendo neurotoxicidad e inmunotoxicidad
a. Relación dosis-respuesta (definición de NOAELs y/o BMD)
b. Modo de acción y relevancia de los efectos tóxicos en humanos
c. Extrapolación a humanos, incluyendo subpoblaciones sensibles
d. Factores de ajustes específicos de la sustancia/preparado
e. Extrapolación vía a vía
MÓDULO 6: Epidemiología y estadística en la evaluación del riesgo toxicológico
a. Dosis-respuesta en epidemiología
b. Evaluación de la incertidumbre
c. Evaluación de la variabilidad
d. Análisis de sensibilidad
MÓDULO 7: Identificación y evaluación de la toxicidad reproductiva y pruebas guía y estrategias
a. Relación dosis-respuesta (definición de NOAELs y/o BMD)
b. Modo de acción y relevancia de los efectos tóxicos en humanos
c. Extrapolación a humanos, incluyendo subpoblaciones sensibles
d. Factores de ajustes específicos de la sustancia/preparado
e. Extrapolación vía a vía
MÓDULO 8: Suplemento sobre áreas de evaluación del riesgo seleccionadas
Se usarán los módulos existentes organizados por las instituciones participantes u organizaciones externas. P.e. cosméticos, productos pesticidas y biocidas, productos de consume, medicamentos de uso humano y veterinario, contaminantes en alimentos, suelos y agua, exposición ocupacional, comunicación del riesgo, sustancias y preparados químicos industriales, las 3Rs de la evaluación del riesgo

Tabla 2. *Relación completa de asignaturas del Grado en Ciencias Ambientales en la Universidad de Zaragoza*

Curso	1º cuatrimestre	2º cuatrimestre
1		
	Bases químicas del medio ambiente	Bases físicas del medio ambiente
	Biología	Botánica. Zoología
	Fundamentos de geología para el estudio del medio ambiente	Edafología
	Fundamentos matemáticos para el estudio del medio ambiente	Administración y legislación ambiental
	Economía aplicada	Estadística
2		
	Ecología I	Ecología II
	Sociedad y territorio	Toxicología ambiental y salud pública
	Meteorología y climatología	Degradación y contaminación de suelos
	Bases de la ingeniería ambiental	Contaminación atmosférica
	Cartografía y sistemas de información geográfica	Análisis instrumental en el medio ambiente
3		
	Riesgos naturales	Gestión y conservación de flora y fauna
	Tecnologías limpias. Energías renovables	Gestión, tratamiento y recuperación de residuos
	Contaminación de aguas	Espacios naturales
	Educación ambiental	Ordenación del territorio y urbanismo
	Actividad agrosilvopastoral y medio ambiente	
4		
	Evaluación de impacto ambiental	Trabajo fin de Grado
	Proyectos y sistemas de gestión ambiental	Prácticas externas
	Auditorías ambientales	
Optativas		
	Documentación científica y técnica	Contaminación radiactiva, acústica y por vibraciones
	Aplicación de residuos al suelo y fertilidad	Acreditación y normas de calidad en laboratorios ambientales
	Tecnología analítica en la detección de contaminantes	Biotecnología y conservación de recursos
	Química ambiental	Biogeografía y geobotánica
	Evaluación de suelos	Teledetección ambiental y SIG
	Actividades clasificadas	Análisis e interpretación del paisaje
		Hidrogeología ambiental
		Ecosistemas fluviales

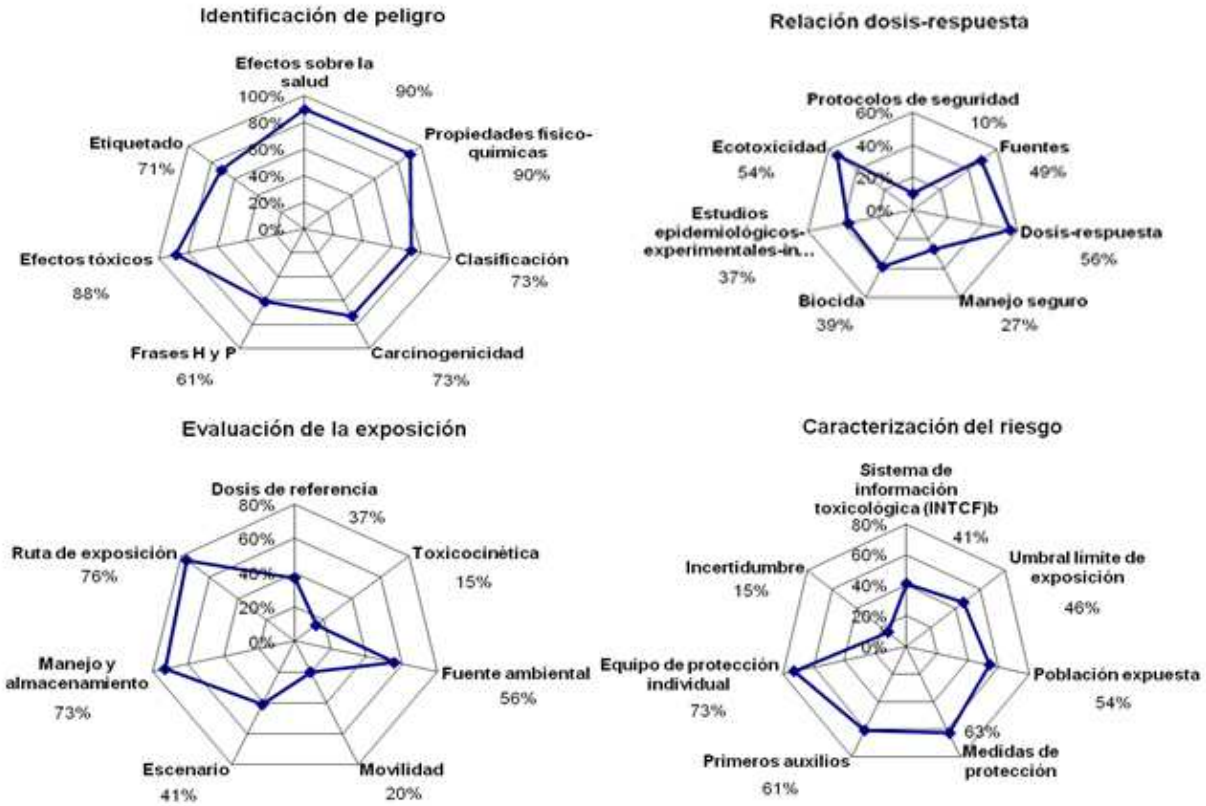


Figura 2. Palabras clave sobre las fases de evaluación del riesgo toxicológico y proporción de respuestas indicadas por los estudiantes.

exposición de la presencia natural de los productos químicos en el medio ambiente para su extracción o síntesis, la producción industrial, transporte, uso y eliminación. En la reunión de la OMS sobre el fortalecimiento de la colaboración global en la evaluación de riesgos químicos, que tuvo lugar en Bonn, Alemania el 29 y 30 de marzo de 2012, se aprobó el establecimiento de una red de evaluación de riesgo químico con el objetivo de proporcionar un foro para la identificación de la falta de conocimiento, las necesidades y cuestiones emergentes, el intercambio de información científica y la colaboración en las actividades de evaluación de riesgos, la identificación de los recursos y el apoyo mutuo. El taller consistió en presentaciones sobre los materiales de capacitación de evaluación de riesgos de la OMS y las actividades recientes de la OMS en el desarrollo de la metodología. La misión de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) es proteger la salud humana y el medio ambiente. Para lograr esta misión, desarrollan y hacen cumplir las regulaciones, ofertan becas para estudiar las cuestiones ambientales, patrocinan asociaciones, enseñan a la población sobre el medio ambiente, y publican la información sobre esta materia. Uno de los aspectos más importantes para los estudiantes españoles (iberoamericanos) es que la EPA ofrece esta información en castellano. Debido a que las evaluaciones de riesgos se llevan a cabo en toda la EPA, las evaluaciones de riesgo son producidos por muchas de las Regiones de la EPA y las Oficinas del Programa relativo al Sistema Integrado de Información de Riesgos de la EPA (IRIS) es un programa de evaluación de la salud humana que evalúa la información de riesgo sobre los efectos que pueden resultar de la exposición a los contaminantes ambientales.

El objetivo general de este artículo es describir la transferencia de conocimientos y la adquisición de estos conocimientos sobre evaluación del riesgo de toxicológico en un entorno académico. Para lograr este objetivo general, se proponen como objetivos específicos son: comparar los conceptos académicos con los utilizados en TRISK como patrón de referencia, y comparar las definiciones de los estudiantes con los conceptos académicos. Indirectamente esto conducirá a correlacionar las definiciones de los estudiantes con el referente TRISK.

Material y métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Zaragoza (Campus de Huesca) a lo largo de primer semestre de 2014. Los participantes son estudiantes de Toxicología Ambiental y Salud Pública (asignatura obligatoria básica de segundo año del Grado en Ciencias Ambientales) que fueron divididos en tres grupos de prácticas. Las actividades prácticas incluyen: trabajos individuales que los alumnos presentan para describir la evaluación del riesgo toxicológico de una sustancia química o mezcla específica, y el estudiante responde a una encuesta sobre los principales conceptos que deben ser cubiertos en una evaluación del riesgo toxicológico. Se solicitaron a los estudiantes los informes de evaluación de riesgo toxicológico de un producto químico específico, lo que les permite mejorar las habilidades en la definición de los problemas, el análisis de los aspectos relevantes, el análisis de los aspectos pertinentes, la formulación de soluciones alternativas, previendo los problemas en la implementación. Para evaluar la transferencia de conocimientos y la adquisición de los conceptos relativos a las fases de evaluación de riesgo toxicológico, se desarrolló un procedimiento de evaluación en dos etapas: en primer lugar, una evaluación subjetiva de los conceptos clave descritos en el trabajo, utilizando como estándar para dicha evaluación los conceptos disponibles en la literatura científica y las clases de teoría; en segundo lugar, una evaluación objetiva de palabras clave determinadas por los estudiantes que describen, según sus criterios, los puntos principales de la evaluación del riesgo toxicológico. El registro y análisis de los datos se realizó con hoja de cálculo Excel. Se propone el cálculo estadístico Kappa para monitorizar la concordancia entre las palabras clave de las categorías en la escala nominal.

Resultados

De los 46 alumnos matriculados en Toxicología Ambiental y Salud Pública, 41 presentaron su trabajo a tiempo (89%). En 31 de los informes presentados (75%) se realizó la evaluación del riesgo toxicológico del hipoclorito de sodio (NaOCl). NaOCl es un desinfectante utilizado para el suministro de tratamiento de agua. De los informes restantes, 3 revisaron acetona; 2 se centraron en amoniaco; otros 2 en benceno y del resto, la evaluación del riesgo toxicológico realizada fue sobre hexaclorobenceno (1), etilenglicol (1), y formaldehído (1). Los principales criterios subjetivos de evaluación de los informes incluyen: base científica del trabajo, buena presentación, referencias correctas y bibliografía, imágenes, tablas y / o figuras incluidas. La base científica del informe debe incluir conceptos clave de la evaluación del riesgo toxicológico como se describe en las clases teóricas (estableciendo como modelo las referencias que aparecen en el apartado de introducción). Se solicitó a cada estudiante que indicara una palabra clave que debería incluirse como un concepto importante en cualquier informe de evaluación del riesgo toxicológico. Después de descartar las palabras clave duplicadas, se recogieron y ordenaron las palabras clave. Las 28 palabras clave de los estudiantes son agrupadas en el orden de los pasos de evaluación de riesgos, con siete palabras clave para cada una de las cuatro etapas de evaluación de riesgo: identificación del peligro, la relación dosis-respuesta, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo. En la figura 2 se presentan los resultados generados con las respuestas de los alumnos. El número que aparece al lado de cada palabra clave representa la proporción media entre las respuestas de estas palabras clave en sus presentaciones de los estudiantes. Como valor de auditoría interna se obtuvieron puntuaciones medias de cada grupo. Como se ha descrito, se desarrolló un procedimiento de evaluación en dos etapas para evaluar la adquisición de los conocimientos sobre las fases de evaluación de riesgos toxicológicos: en primer lugar, una evaluación subjetiva de los conceptos clave cubiertos en el trabajo, con el estándar para la evaluación establecida en las clases de teoría (con las referencias indicadas); en segundo lugar, una evaluación objetiva de palabras clave determinadas por los propios estudiantes que describen, con sus criterios, los puntos principales de la evaluación del riesgo toxicológico. Se presenta la calificación media de cada grupo. Los valores entre paréntesis representan las calificaciones en evaluación subjetiva u objetiva: el primer valor (a) representa la evaluación subjetiva (punto de vista del profesor-TRISK; un total de 22 puntos) y el segundo (b) representa el punto de vista de la evaluación objetiva (estudiantes y profesor, que representa un total de 28 puntos). Cada calificación media se obtiene de forma automática con la fórmula: (a + b) * (10/50). Las calificaciones medias de los grupos de prácticas son: Grupo 1: 5,51 (12,64; 14,92); Grupo 2: 5,20 (11,38; 14,62); Grupo 3: 6,01 (14,21; 15,85). Se indican entre paréntesis el promedio a y b de cada grupo.

Un ejemplo de índice de informe de evaluación del riesgo realizado por un estudiante se muestra en la tabla 3. Como se propone en clase, el informe evalúa el riesgo del hipoclorito sódico (NaOCl), sustancia química con diversos usos, tanto industrial, como comercial y doméstico.

Este trabajo representa una etapa clave para el aseguramiento de la calidad. Las respuestas de los estudiantes deben estar basadas en las clases de teoría y también en referencias científicas. Se proponen las fichas de datos de seguridad de la información (tabla 4) para ser incluido en la fase de identificación de peligros, según el artículo 31 del reglamento REACH [iv], de tal forma que se actualiza la información presentada por Martínez et al., 2005 [v]. Para más información se recomienda consultar la versión 2 del Documento de orientación sobre la elaboración de fichas de datos de seguridad (Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas, disponible en: http://echa.europa.eu/).

El estándar de referencia propuesto para los trabajos relacionados con NaOCl fue el Informe de Evaluación de Riesgos de hipoclorito

Tabla 3. *Ejemplo de índice de evaluación del riesgo toxicológico realizado por alumno sobre hipoclorito sódico:*

1. Evaluación del riesgo toxicológico (NaOCl)
   - 1.1. Identificación de peligros: Caracterización toxicológica
     - 1.1.1. Propiedades físicas y químicas del NaOCl
     - 1.1.2. Toxicidad para la salud humana
     - 1.1.3. Ecotoxicidad: efectos sobre el medio ambiente
     - 1.1.4. Propiedades biocidas
   - 1.2. Evaluación de la exposición
     - 1.2.1. Descripción físicoquímica del lugar
     - 1.2.2. Descripción de las poblaciones expuestas al peligro
     - 1.2.3. Descripción de las rutas de exposición
       - 1.2.3.1. Fuente
       - 1.2.3.2. Transporte y destino
       - 1.2.3.3. Punto de exposición
       - 1.2.3.4. Rutas de exposición
     - 1.2.4. Selección de las rutas de exposición significativas
   - 1.3. Evaluación de la toxicidad o curva dosis-respuesta
     - 1.3.1. Relación estructura-actividad
       - 1.3.1.1. Estudios toxicológicos
       - 1.3.1.2. Índice de toxicidad no carcinógena
         - 1.3.1.2.1. Toxicidad aguda
         - 1.3.1.2.2. Dosis de referencia crónica o subcrónica
   - 1.4. Caracterización del riesgo
     - 1.4.1. Resultados
     - 1.4.2. Incertidumbre
2. Conclusiones

de sodio realizado por el Comité Científico de los Riesgos Sanitarios y Medioambientales (SCHER, por sus siglas en inglés) [vi]. Ninguno de los informes presentados se centró en los trihalometanos (THM) presentes en el agua potable y sólo un informe presentó las cloraminas como problemas relacionados con cloro en las piscinas. Cabe señalar que estos subproductos del tratamiento de agua se explicaron después de la presentación del trabajo. El ámbito de seguridad alimentaria queda incluido con el enfoque realizado en esta sustancia, con diferentes vías de exposición, permitiendo poner en práctica algunos de los aspectos comentados por Fernández M et al., 2010 [vii]. Adicionalmente permite ejecutar algunas de las propuestas realizadas por Drobne, 2000 [viii].

El enfoque de la metodología de aprendizaje del curso mediante la resolución de problemas permite optimizar la experiencia de aprendizaje y facilita a los estudiantes a desarrollar nuevos enfoques para la recuperación y análisis de la información de forma autónoma [ix], lo cual genera un conocimiento más profundo [x, xi].

TRISK está dirigido a llenar la falta de planes de formación y proporcionar oportunidades desde un punto de vista práctico, en capacitar para el trabajo de evaluación de riesgos a los jóvenes científicos o recién graduados interesados en seguir esta área de especialización, así como expertos capacitados interesados en participar como miembros de los diversos comités científicos.

El proyecto se centra en la comprensión de los requisitos técnicos y las habilidades que necesitan los evaluadores de riesgos para diseñar un programa de formación modular, que abarca una gama de disciplinas en la evaluación del riesgo, y proporcionando una guía potencial para establecer directrices para la formación y el reconocimiento de los evaluadores de riesgos.

En la segunda parte de la asignatura de Toxicología Ambiental y Salud Pública, los módulos prácticos específicos de Salud Pública, se centran en los riesgos para la salud pública de los cosméticos, los productos fitosanitarios y biocidas, productos de consumo, medicamentos y medicamentos veterinarios, contaminantes en los alimentos, el suelo y el agua [xii], la exposición ocupacional de riesgo, comunicación, productos químicos industriales, 3Rs en la evaluación de riesgos.

Aquí se muestran los resultados de los conceptos de evaluación de riesgos toxicológicos adquiridos por los estudiantes, en comparación con TRISK y otras normas [xiii]. Los resultados muestran lo importante que es mejorar la transferencia de conocimiento en el entorno académico. Este estudio puede ser un punto de partida para

Tabla 4. *Ficha de datos de seguridad*

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa	1.1. Identificador del producto
	1.2. Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados
	1.3. Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad
	1.4. Teléfono de emergencia
SECCIÓN 2: Identificación de los peligros	2.1. Clasificación de la sustancia o de la mezcla
	2.2. Elementos de la etiqueta
	2.3. Otros peligros
SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes	3.1. Sustancias
	3.2. Mezclas
SECCIÓN 4: Primeros auxilios	4.1. Descripción de los primeros auxilios
	4.2. Principales síntomas y efectos, agudos y retardados
	4.3. Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente
SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios	5.1. Medios de extinción
	5.2. Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla
	5.3. Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios
SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental	6.1. Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia
	6.2. Precauciones relativas al medio ambiente
	6.3. Métodos y material de contención y de limpieza
	6.4. Referencia a otras secciones
SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento	7.1. Precauciones para una manipulación segura
	7.2. Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades
	7.3. Usos específicos finales
SECCIÓN 8: Controles de exposición/protección individual	8.1. Parámetros de control

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas	9.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas
	9.2. Información adicional
SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad	10.1. Reactividad
	10.2. Estabilidad química
	10.3. Posibilidad de reacciones peligrosas
	10.4. Condiciones que deben evitarse
	10.5. Materiales incompatibles
	10.6. Productos de descomposición peligrosos
SECCIÓN 11: Información toxicológica	11.1. Información sobre los efectos toxicológicos
SECCIÓN 12: Información ecológica	12.1. Toxicidad
	12.2. Persistencia y degradabilidad
	12.3. Potencial de bioacumulación
	12.4. Movilidad en el suelo
	12.5. Resultados de la valoración PBT y mPmB
	12.6. Otros efectos adversos
SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación	13.1. Métodos para el tratamiento de residuos
SECCIÓN 14: Información relativa al transporte	14.1. Número ONU
	14.2. Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas
	14.3. Clase(s) de peligro para el transporte
	14.4. Grupo de embalaje
	14.5. Peligros para el medio ambiente
	14.6. Precauciones particulares para los usuarios
	14.7. Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y del Código IBC
SECCIÓN 15: Información reglamentaria	15.1. Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla
	15.2. Evaluación de la seguridad química
SECCIÓN 16: Otra información	

la ejecución de un proyecto que refuerce la importancia y necesidad de la evaluación de riesgos, así como el impacto y las contribuciones de esta disciplina a nivel local. En este marco cabe destacar la reciente publicación del artículo sobre RicoTox [xiv], página web sobre Riesgo Químico de Tóxicos (http://ricotox.weebly.com), desarrollada en la enseñanza universitaria de la asignatura de Toxicología Ambiental y Salud Pública, excelente iniciativa liderada por la Dra. Oropesa en la Universidad de Extremadura.

Bibliografía

1. Decision No 1350/2007/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2007 establishing a second programme of Community action in the field of health (2008-2013).
2. Frutos Pérez-Surio A, Gayán Margelí N. Toxicología ambiental y salud pública en la Universidad de Zaragoza: Adecuación de la guía docente mediante una matriz de contextualización en el Grado en Ciencias Ambiental. Rev. Toxicol. 2012; 29, 147-150.
3. Kleinjans JCS. Principles in toxicological risk analysis. Toxicol. Letters. 2003; 140, 311-315.
4. International Program on Chemical Safety. World Health Organization [acceso 28 de septiembre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/en/.
5. United States Environmental Protection Agency [actualizada el 21 de septiembre de 2015; acceso 28 de septiembre de 2015] Disponible en: http://www.epa.gov/.
6. REGLAMENTO (CE) No 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) no 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) no 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.
7. Martínez M, Martínez MA, Martínez-Larrañaga MR, Caballero V, Anadón A. Clasificación toxicológica, envasado y etiquetado de productos químicos. Rev. Toxicol. 2005; 22: 162-168.
8. SCHER, scientific opinion on the risk assessment report on Sodium hypochlorite, CAS 7681-52-9, human health part, 15 January 2008. [acceso 28 de septiembre de 2015] Disponible en: http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_080.pdf.
9. Fernández M, Moyano R, Cameán AM. Posibilidades de formación en Seguridad Alimentaria en el contexto educativo universitario. Rev. Toxicol. 2010; 27, 57-61.
10. Drobne D. Toxicology has to use opportunities given by Bologna reform of higher education. Toxicol. Letters. 2000; 190, 116-122.
11. Bergendorff B. Toxicological programmes and teaching methods. Toxicol. Letters. 2000; 112, 391-393.
12. Ettlin RA, Hodel CM. Professional opportunities for toxicologists: the requirements of the private sector for education/teaching. Toxicol. Letters. 2000; 112, 371-378.
13. Pratt I. Professional opportunities for toxicologists: the requirements of the public sector for education/teaching. Toxicol. Letters. 2000; 112, 379-382.
14. Sabroso MC, Pastor A. Guía sobre suelos contaminados. Zaragoza. CEPYME Aragón-Gobierno de Aragón; 2004.
15. ECHA. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter.8: characterization of dose [concentration]-response for human health. In: ECHA (Ed.), vol. ECHA-2010-G-19-EN. ECHA; 2010.
16. Oropesa AL. RicoTox: web sobre riesgo químico. Experiencia en la enseñanza universitaria de Toxicología Ambiental y Salud Pública. Rev. Toxicol. 2014; 31, 71-76.

Rev. Toxicol (2015) 32: 95-97

Niveles de plomo en sangre de niños expuestos a los residuos metalúrgicos en Abra Pampa, Jujuy (Argentina)

Tschambler JA, Wierna NR, Romero AE, Rios FT, Ruggeri MA, Bovi Mitre MG*

Grupo INQA (Investigación Química Aplicada). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy. Alberdi 47, CP: 4600, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina

Resumen: Abra Pampa es una pequeña comunidad situada en el norte de Argentina, donde los desechos de plomo de una planta metalúrgica (Metal Huasi) se abandonaron por más de 40 años, dejándolos en el centro del pueblo. Con el fin de medir la exposición a estos residuos peligrosos, se determinaron los niveles de plomo en sangre en niños de edades comprendidas entre 5 y 14 años (n=234). Los niños incluidos en la muestra habían estado expuestos, por el aire y el suelo, al plomo durante cinco años por lo menos porque vivían alrededor de la montaña de residuos. Fueron evaluados clínicamente. Para determinar el estado nutricional se midió el peso y talla y se calculó el índice de masa corporal total. Se realizó el análisis de plombemia mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica-atomización electrotérmica. La prevalencia de intoxicación (Pb> 10 µg / dL) fue de 28%. El 81% de los niños estudiados tenían niveles de plomo en sangre superiores a 5 µg / dL, lo que se considera un riesgo en el desarrollo neuromadurativo. También se encontraron diferencias significativas según la edad y la distancia entre las casas de los niños y el sitio de disposición de los residuos. Estos resultados mostraron que los residuos son una fuente de exposición al plomo para los niños que viven cerca del depósito de escorias y generaron estrategias de remediación para minimizar la exposición infantil.

Palabras claves: Plomo, exposición, salud infantil, riesgo neuromadurativo

Abstract: Lead levels in blood of children exposed to metallurgical waste in Abra Pampa, Jujuy (Argentina)

Abra Pampa is a small community located in North Argentina, where lead wastes from a metallurgical plant were improperly managed. Therefore, in order to define the exposure to this hazardous waste, blood lead levels in children aged between 5 and 14 years were determined. The prevailing state of poisoning (Pb > 10 µg / dL) was 28%. Furthermore, 81% of the studied children had blood-lead levels higher than 5 µg / dL, which is considered a neurocognitive risk. Significant differences according to age and distance between the children's houses and the disposal site were also found. These results showed that the waste is a source of lead exposure for children living next to the disposal site; therefore, a remediation program is being performed in the area.

Key words: Lead exposure, poisoning, child health, neurocognitive risk

Introducción

Abra Pampa se encuentra en la Puna, región geográfica en el norte de la provincia de Jujuy, Argentina (22° 43 'S, 65 ° 42' W), a 200 km de San Salvador de Jujuy, capital de la provincia, a 3.484 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de 8,7 ° C. El viento norte que sopla en la zona, es seco y caliente pudiendo alcanzar una velocidad de 120 kilómetros por hora. Los últimos datos registran en Abra Pampa que aproximadamente el 40 % de la población son niños menores de 14 años.

De 1955 a 1989, una empresa de fundición de plomo llamada "Metal Huasi" operaba en la zona urbana de Abra Pampa, Jujuy, Argentina. La propiedad fue abandonada posteriormente dejando aproximadamente 10.000 toneladas de residuos, según estimaciones por el tamaño de la montaña y 600 toneladas de ceniza, constituyendo una importante fuente de exposición al plomo. Diez años después de abandonarse la metalúrgica, parte de estos residuos se utilizó para construir la defensa a lo largo del río Tabladitas que está en la frontera norte de la ciudad y también se utilizó esta escoria para hacer rellenos en los terrenos donde se construyeron las casas del barrio "12 de Octubre", constituyendo nuevas fuentes de contaminación. El análisis de suelo en la ciudad y sus alrededores mostró una importante concentración de plomo bioaccesible (20.750 mg / Kg [1], y por lo tanto, teniendo en cuenta esta vía de exposición, los niños fueron declarados población en riesgo ya que son particularmente vulnerables a los efectos tóxicos del plomo. Así, los niños que tienen una baja ingesta de hierro y calcio, situación frecuente en esta población y que están en contacto con el suelo contaminado merecen más atención ya que la absorción del tóxico es mayor en ellos [2].

En 1991, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) [3] en los Estados Unidos, definió que una concentración de plomo en sangre de 10 µg / dL es un nivel de preocupación ya que indica una intoxicación [4]. También se refiere que éste no es el nivel umbral para los efectos nocivos producidos por el plomo. La CDC reconoce que puede haber efectos adversos en el organismo humano en niveles menores que éste [5].

De hecho, existe evidencia significativa que muestra el efecto negativo en la salud intelectual y los impactos socio-neuroconductuales como consecuencia de exposición al Plomo que se manifiesta con concentraciones del tóxico en sangre de los niños a partir de los 5 µg / dL [4]. Se realizó un estudio en Abra Pampa con el fin de medir la exposición al plomo en niños que habitan zonas aledañas al depósito de Metal Huasi.

Material y métodos

Se trabajó con el mapa de la localidad y alrededor de Metal Huasi se trazaron cinco círculos concéntricos con una distancia de 100 m entre ellos (Figura 1), con la finalidad de conocer la posible influencia de la distancia al foco sobre los valores de plombemia.

Se entrevistaron a los adultos residentes en 450 viviendas de las manzanas ubicadas hasta 500 m a la redonda del foco contaminante principal (la montaña de residuos). Los resultados indicaron que 300 niños cumplían con los criterios de inclusión establecidos en el diseño del estudio (5 a 14 años de edad, estado nutricional adecuado según el IMC, residencia cercana al foco, cinco años de residencia en la ciudad).

Se informó a los padres o tutores sobre los objetivos del estudio y se solicitó la firma del consentimiento informado que autorizaba la inclusión de los niños en esta investigación. Para determinar el estado nutricional se midió el peso y talla [6-7] y se calculó el índice de masa corporal total (IMC) [8]

De 234 muestras de sangre, 131 fueron de mujeres (56%) y el 44% de varones El rango de edad predominante fue de 7 a 8 años. Los niños incluidos en la muestra habían estado expuestos al plomo durante cinco años por lo menos lo cual es un criterio de selección para la población expuesta [9].

Se realizó la extracción de sangre, con jeringa humedecida con el

*e-mail: gbovi@imagine.com.ar

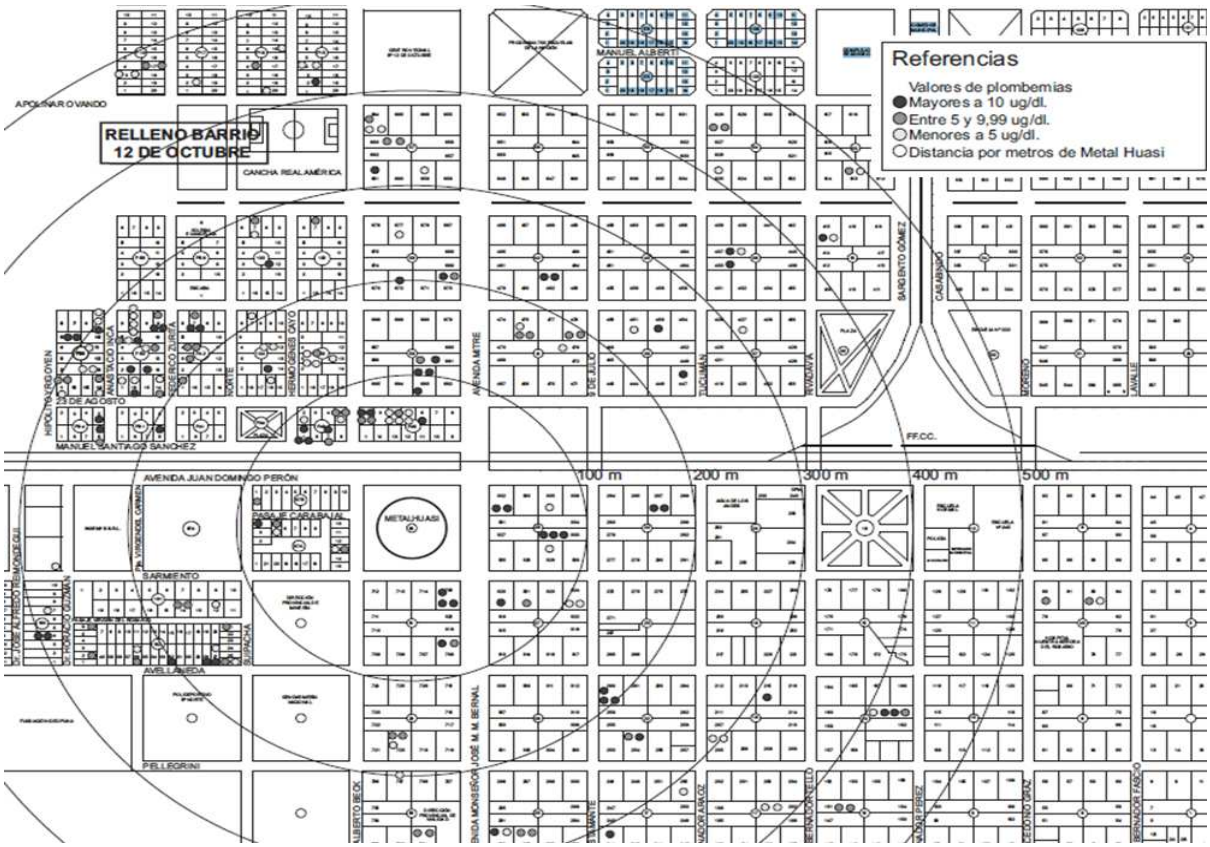


Figura 1. Ubicación de las casas de los niños evaluados de acuerdo a la concentración de nivel de plomo en la sangre

anticoagulante, por venopunción. La temperatura de almacenamiento y de traslado de las muestras fue de 4° C. Se realizó el análisis de plombemia mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica-atomización electrotérmica con un equipo Varian con corrección zheman. La recuperación del método analítico fue de 92%. El límite de cuantificación es 1 µg / dL y el límite de detección es 07, µg/ dL.

Los datos fueron ingresados a una base de Excel y procesados con el paquete estadístico SPSS v. 12.0, se calcularon las medias y porcentajes según correspondían, se usó el chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre la presencia de intoxicación plúmbica y las otras variables medidas, se calculó el OR con su intervalo de confianza al 95%. Se consideró un $p<0,05$ como significativo [10-11].

Resultados

Las plombemias se determinaron en un total de 234 niños, de los cuales, el 28% tenían valores mayores de 10 µg / dL. Además se observa que la media disminuye con la edad (Tabla1).

Tabla 1. *Niveles de plomo en sangre de los niños evaluados en Abra Pampa*

Grupo de edad	Plomo en sangre (µg / dL) Media (desviación estandard)	n	% de niños de acuerdo a los niveles de plomo en sangre (µg / dL)			
			< 5	5 - 9	10 - 19	> 20
< de 6 años	9,28 ± 4,96	8	-	75	12.5	1
6 a 10 años	9.04 ± 4.32	163	15	52	31	2
> 10 años	7.57 ± 4.02	63	32	47	19	2
Significancia	P = 0,008; α = 0,05					

Se analizaron también las plombemias en función del sexo no observándose diferencias significativas entre ellos (Tabla 2).

Tabla 2. *Niveles de plomo en sangre según el sexo de los niños evaluados en Abra Pampa*

Género	n	Plomo en sangre (µg / dL) Media (desviación estandard)	% de niños de acuerdo a los niveles de plomo en sangre (µg / dL)		
			< 5	**5 - 9**	**> 10**
Mujeres	131	8,43 ± 3,92	22,1	52,9	25
Varones	103	8,87 ± 4,71	13,6	53,4	33

Con el fin de definir la fuente de exposición, los hogares de niños fueron localizados en función de la distancia a la fundición.

Los resultados registrados en la Tabla 3 mostraron que 93 de los 234 niños que viven entre 100-200 metros de Metal Huasi tenían las máximas concentración de plomo en sangre cuantificadas (máximo 15,80 µg / dL).

Tabla 3. *Concentraciones de plomo en sangre de los niños evaluados en Abra Pampa según la distancia de los hogares a Metal*

Distancia a la fundición (en metros)	Plomo en sangre (µg / dL) Media (desviación estandard)	n	% de los niños de acuerdo a los niveles de plomo en sangre (µg / dL)			
			< 5	**5 - 9**	**10 - 19**	**> 20**
100	9,62 ± 4,48	52	19.6	37.2	41.2	1.9
200	9,71 ± 6,09	42	12	59.5	19	9.5
300	8,88 ± 3,59	75	16	51	33	0
400	8,18 ± 3,46	21	19	57	24	0
500	6,36 ± 2,19	16	25	62.5	12.5	0
Mayor de 500	6,32 ± 2,32	28	32	61	7	0

El estudio estadístico muestra que hubo diferencias en los niveles de plomo en sangre de acuerdo con la distancia desde el centro contaminante. [F (2,231) = (9,674, p = 0,001]

Después de llevar a cabo la prueba a posteriori de Tukey, se observó que había diferencias entre los niños que viven dentro de un área de 0 a 200 metros del principal centro contaminante y aquellos que viven en un radio de más de 500 metros de metal Huasi (p = 0,0001). Además, había diferencias entre los niños que viven en un radio de 201 y 400 metros, y los que viven en un radio de más de 401 metros (p = 0,005). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los niveles de plomo encontrados en los niños que viven dentro de un radio de 0 a 200 metros y los que viven en un radio de 201 a 400 metros del principal centro contaminante (Figura 1).

Considerando la escoria en el barrio 12 de octubre, los resultados no mostraron ninguna correlación entre los niveles de plomo en la sangre y la distancia a la misma. Por consiguiente, se puede afirmar que el punto de contaminante principal es Metal Huasi

Discusión

Los resultados de Abra Pampa sugieren que a menor edad el niño está más expuesto al plomo. Esto tiene que ver con factores como el hábito de pica, las conductas de riesgo y la costumbre de jugar en el suelo contaminado. Nuestros datos coinciden con las investigaciones llevadas a cabo en México [12].

Se compararon los niveles de plomo en sangre en niños y niñas (Tabla 2). Los resultados mostraron diferencias no estadísticamente significativas entre sexos. Teniendo en cuenta que sí se observó diferencias en otros escenarios [2] la falta de diferencia en Abra Pampa puede explicarse postulando una ruta común de exposición para los niños y niñas, es decir, el suelo / polvo ingestión / inhalación.

En investigaciones internacionales se determinó el impacto que el Plomo tiene sobre el desarrollo neuromadurativo de los niños, hallándose un efecto negativo en el desarrollo mental de los niños que tienen concentraciones de plomo en sangre sustancialmente por debajo de la norma de 10 µg / dL, lo que sugiere la necesidad de una normativa más estricta [13]. Es así como investigaciones sobre Salud Infantil plantean que debe considerarse el nivel seguro del Plomo en sangre menor a 10µg/dL.

La exposición crónica a pequeñas dosis de Plomo está asociada a efectos subclínicos tales como hipertensión, daño en la función renal, disfunciones cognitiva y trastornos en la reproducción. Estos efectos adversos están asociados a plombemias superiores a 5 µg / dL [14]. Por los numerosos trabajos que acreditan que la exposición a concentraciones menores a 10µg/dl de plomo en sangre causa daño en la población y en particular la población infantil [15] se consideró como valor de preocupación para los niños de Abra Pampa los valores superiores a 5 µg / dL, concluyendo que el 81% de los niños evaluados está en riesgo.

En cuanto a las vías de exposición, la Tabla 2 muestra que los niños más pequeños tenían niveles más altos de plomo en sangre, por lo que, se estableció que la ingestión y la inhalación de polvo del suelo son las vías más importantes de exposición de la zona. Por lo tanto, la eliminación de la escoria y la remediación del suelo deben ser los objetivos del programa de reducción de riesgo en Abra Pampa. Además, se está diseñando un programa educativo para la Prevención de intoxicaciones y por otra parte es necesario diseñar investigaciones que permitan medir el efecto adverso del Plomo en el desarrollo neuromadurativo de estos niños [16-17-18].

Bibliografía

1. Vargas N, Tschambler J, Wierna N, Avila N, Farias S, Díaz Barriga F, Bovi Mitre G (2007) Estudio de niveles de Plomo en Suelos de la localidad de Abra Pampa, Jujuy. Libro de Resúmenes del XV Congreso Argentino de Toxicología 49 p.
2. Aguilar Valdez J, Mas Bermejo P, Romero Placeres M, García Roche R, Sardiñas Peña O, Orris P (2003) Niveles de plomo en sangre y factores Asociados en Niños de municipio de Centro Habana. Rev. Cubana Hig Epidemiol 41 (2).
3. CDC- US Centers for Disease Control (1991) Preventing lead poisoning in young children. US Department of Health and Services Atlanta.
4. Canfield R L, Henderson CR Jr, Cory-Slechta, D.A, Cox C, Jusko,TA, Lanphear BP. (2003) Deterioro intelectual en niños con concentraciones de plomo en la sangre por debajo de 10 microgramos por decilitro. N. Engl J Med. 348:1517-1526.
5. CDC- US Centers for Disease Control (2007) Interpreting and a Managing Blood Lead level µg/dl in Children and reducing Chilhood Exposures to Lead. 56 (RR08) 1-14.
6. Contreras M, Valenzuela R (2004) La medición de la talla y el peso. Guía Para El personal de la Salud del cebador Nivel de Atención: INS.
7. Grupo de Trabajo de la OMS. "Uso e interpretación de indicadores antropométricos del estado nutricional" World Health Organ Bull 1986: 64 (6) 929-41.
8. Narváez, G, Narváez X (2001) Nueva Visión y perspectivas. Laboratorio de evaluaciones morfofuncionales LABEMORF, Quito Ecuador
9. Kageyama ML, Sanín-Aguirre LH, Romieu I (1997) Manual de muestreo poblacional. Aplicaciones en Salud Ambiental. México, DF: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 42-43.
10. Martínez-González MA, Sánchez Villegas A, López del Burgo C (2006) Introducción a los Modelos multivariables, Bioestadística Amigable Cap 12:685-750.
11. Ortiz Z, ME; Esandi, Bartman M (2004) Módulo de Epidemiología Básica y Vigilancia de la Salud.
12. Azcona MI, Rothenberg SJ, L Schnaas, M Romero, Perroni E. "Niveles de plomo en sangre en Niños de 8 a 10 Años y s u Relación con la Alteración en el Sistema vasomotor y del equilibrio" Apocalipsis de Salud Publ Méx 2000; 42 (4): 279-287
13. Canfield, R. (http//ihealthbulletin.com/blog/2007/11/21) "Even low lead levels might harm brain function in children" Published November 21st, 2007 in Children, General Interest, Health, Health News, Health and Wellness, Kids, Life, Medical News, Medicine, Mental Health, Parents, Popular**.**
14. Kosnet M, Wedeen R, Rothemberg S, Hipkins K, Materna B, Scwartz BS, Hu H, Woolf A (2007) Recommendations for Medical Management of Adult Lead Exposure. Environmental Health Perspect 115(3):463-471
15. Lampheart BP, Dietrich K, Auinger P,Cox C (2000) Cognitive deficits associated with blood and concentrations < 10mcg/dL in children and adolescents. Public Health Rep. 115(6):521-910
16. Stiles KM, Bellinger DC (1993) Correlatos neuropsicológicos de la exposición bajo el nivel de plomo en los niños en edad escolar: un estudio prospectivo. Neurotoxicol Teratol 15: 27 – 35
17. Wasserman GA, Liu X, Popovac D, Factor-Litvak P, Kline J, Waternaux C et al.(2000) The Yugoslavia Prospectie Lead Study: contributions of prenatal and postnatal lead exposure to early intelligence.Neurotoxicol Teratol 22:811-8
18. Lidsky TI, Schneider JS (2003) Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. Brain 126, 5-19

Intoxicaciones inadvertidas por monóxido de carbono: una epidemia oculta

Vázquez Lima M J, Álvarez Rodríguez C *, Cruz Landeira A, López Rivadulla M

Servicio de Urgencias del Hospital do Salnés. Villagarcía de Arousa (Pontevedra).

Resumen: Diferentes autores afirman que existe un elevado volumen de intoxicaciones por monóxido de carbono que pasan inadvertidas para el personal sanitario, lo que representa un importante problema de salud.

Para confirmar esta hipótesis en un área de salud determinada, sobre la que se dispone de reciente información en relación al volumen de intoxicaciones que sí son detectadas, se realizó este trabajo. Para ello, se seleccionó como población de estudio al conjunto de pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital do Salnes, por cualquier motivo, durante el mes de febrero de 2013. Se recogió una amplia muestra representativa de esta población por un sistema aleatorio sistemático, quedando constituida por 1501 pacientes. A todos ellos se les realizó una medición no invasiva de carboxihemoglobina mediante pulsicooximetría con el objetivo de detectar todas las intoxicaciones, tanto las sospechadas por el personal sanitario como las que pasarían inadvertidas. El número de intoxicaciones detectadas en la muestra fue de 10, lo que representa el 0,7% (± 0.34% p< 0.05) de las urgencias atendidas, siendo 18 (8,8-27,1) el número de casos esperados para la población de estudio. Esta cifra fue muy superior a la de intoxicados que se detectaron en el trabajo ordinario del personal sanitario durante los diez años previos, en el mismo mes de febrero y en el mismo centro sanitario, con una media anual de 1.3 casos (DS: 2.8), por lo que se concluye confirmando la hipótesis de que el número de intoxicaciones inadvertidas por monóxido de carbono es muy elevado.

Palabras clave: Monóxido de carbono. Intoxicación por monóxido de carbono. Carboxihemoglobina. Toxicología. Urgencias médicas.

Abstract: Undetected carbon monoxide poisoning: an occult epidemic

Some authors say that there is a high number of carbon monoxide poisoning undetected by medical doctors. That means an important health problem.

To support this hypothesis we selected an emergency department where we know the number of carbon monoxide poisoning detected in the past.

We studied a group of people who came to the emergency department of the Hospital do Salnés in February 2013. We selected 1501 patients using a simple random sampling system. In each of the patients in the sample we measured the carboxyhemoglobin using the pulse co oximetry. The purpose was to detect all poisoned patients. The number of carbon monoxide poisoning detected in the random sample was 10. That means 0.7% (± 0.34% p <0.05) of all the people who went to the emergency department in February. That also means that the number of carbon monoxide poisoning expected for the study population would be 18 (8.8 to 27.1) This number was much higher than the number detected in the ordinary work of emergency physicians during the past ten years, in the month of February and in the same emergency department. They detected an average annual 1.3 poisonings (SD: 2.8). We conclude that the number of undetected carbon monoxide poisoning is very high.

Keywords: Carbon Monoxide. Carbon monoxide poisoning. Carboxyhemoglobin. Toxicology. Emergencies

*e-mail: cesareo.alvarez@gmail.com

Introducción

La intoxicación por monóxido de carbono (CO) representa la intoxicación más frecuente en nuestro medio como consecuencia de la exposición a gases tóxicos [1]. Tiene mayor incidencia en invierno, afectando tanto a hombres como a mujeres, a adultos y a niños. Suele ocurrir en accidentes domésticos, en relación con la combustión incompleta en estufas, calentadores, calderas o braseros, debido a un déficit parcial de O_2 en el proceso de combustión [2].

El sistema de toxicovigilancia de la sección de toxicología clínica de la Asociación Española de Toxicología, en el que participaron 15 hospitales de diversas comunidades autónomas, ha registrado entre los años 2004 y 2008 una media de 175 intoxicaciones por CO anuales, con un promedio de 3 muertos cada año de entre los que llegaron vivos al hospital. A partir de estas cifras puede estimarse que en nuestro país se producen cada año unos 2000 casos de intoxicaciones por CO con una tasa de mortalidad aproximada del 4% [3,4].

Pero quizá el problema epidemiológico sea incluso mayor de lo que se ha descrito, puesto que diversos autores han señalado un elevado volumen de intoxicaciones ocultas por CO en la mayoría de las poblaciones [5,6], sugiriendo cifras alarmantes de intoxicaciones inadvertidas próximas al 40% del total de intoxicados para algunos investigadores [7] e incluso mucho mayores para otros [8,9].

Sabiendo que el papel de los servicios de urgencias en la detección de intoxicaciones es relevante [10-12] , se planteó la hipótesis de que de que existe elevado volumen de intoxicaciones inadvertidas por CO en el Área Sanitaria do Salnés, no detectadas en los servicios de urgencias, en consonancia con la literatura científica para otras poblaciones, planteándose como objetivo estimar su volumen a partir de la información obtenida en estudios previos sobre intoxicaciones por CO en el Área, conociéndose el volumen de intoxicaciones advertidas en el Servicio de Urgencias del Hospital do Salnés y su tasa [13].

Material y métodos

Se estableció como población de estudio la constituida por todos los pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital do Salnés, de cualquier edad y por cualquier motivo, durante el mes de febrero de 2013. Se eligió febrero por ser un mes de máxima prevalencia de intoxicaciones advertidas por CO en el Área [13]

Mediante un sistema de muestreo aleatorio sistemático, se incluyeron de manera secuencial, al menos, a uno de cada dos pacientes consecutivos que acudieron a urgencias, asegurando una amplia muestra aleatoria, en la que se seleccionaron pacientes que consultaron a cualquier hora del día o de la noche.

Se siguió el procedimiento de que a todos los pacientes de la muestra se les realizó una medición no invasiva de COHb mediante pulsicooximetría en la Zona de Triaje del Servicio de Urgencias [14-16], para evitar retrasos en su determinación. Y a todos se les preguntó sobre su hábito tabáquico actual (si eran o no fumadores).

Como material se utilizó el alizador The Masirno Rainbow SET ® Rad 57 Pulse CO-Oximeter (Rad 57) [17], un analizador no invasivo continuo con capacidad para determinar la saturación de carboxihemoglobina (SpCO), entre un mínimo y un máximo del 1% al 100%, teniendo una precisión de ± 3% en el intervalo del 0% al 40% [7,18,19].

Como criterio diagnóstico de intoxicación por CO habitualmente se utilizan cifras de COHb iguales o superiores a 10% en adultos o al 2%

en niños [20-22]. Sin embargo, debido a las limitaciones de la pulsicooximetría consideramos que, para que el diagnóstico fuera de alta probabilidad, las cifras de CO medidas con pulisicooximetro (SpCO) deberían ser superiores al 15%.

El análisis estadístico fue realizado el paquete Statistical Packageforthe Social Sciences versión 20,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) utilizándose el estadístico T de Student para comparar las medias y el Chi-cuadrado para los porcentajes. Se comprobó que las variables se ajustaban a la normalidad mediante el test de Kolmogorov Smirnov.

Los intervalos de confianza fueron calculados con el aplicativo OpenEpi versión 3.0.1

Resultados

La población de estudio quedó definida por 2694 pacientes que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital do Salnés en febrero de 2013, siendo el tamaño muestral de 1501 pacientes , lo que representa el 55.7% de la población de estudio.

En la Tabla 1 se exponen la distribución de frecuencias de SpCO observadas en la muestra.

Tabla 1. *Frecuencia de las cifras de SpCO observadas en la muestra*

SpCO	Frecuencia obsevada en la muestra	Porcentaje
1	843	56,2
2	262	17,5
3	123	8,2
4	60	4
5	61	4,1
6	53	3,5
7	23	1,5
8	23	1,5
9	12	0,8
10	6	0,4
11	5	0,3
12	8	0,5
13	5	0,3
14	6	0,4
15	1	0,1
16	3	0,2
17	2	0,1
19	1	0,1
29	1	0,1
30	2	0,1
35	1	0,1
Total	1501	100

Intoxicaciones advertidas

Nuestro grupo de trabajo, en estudio previo, determinó que el número total de intoxicaciones detectadas en los meses de febrero, entre los años 2002 y 2011 fue de 13, lo que representaba una media anual de 1.3 casos (DS: 2.8) [13]

Tabaco y SpCO

Las cifras medias de SpCO de los 1501 pacientes fueron de 2.43% (± 2.8), siendo la mínima de 1% y la máxima de 35%. Como era de esperar, los fumadores tuvieron cifras mayores que los no fumadores, tanto en términos generales como en el grupo de pacientes no intoxicados, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre los intoxicados (Tabla 2).

Discusión

Discusión de los métodos empleados

Con la muestra obtenida de 1501 determinaciones de CO sobre las 2694 posibles de la población de estudio, y asumiendo un nivel de confianza del 95%, el EEp (error estándar de la probabilidad de estar intoxicado) fue de 0.34, con lo que le intervalo de confianza de la muestra fue de ± 0.34.

Tabla 2. *Cifras medias de SpCO*

	Fumadores	No fumadores	p
Todos	3.5 (±2.8)	2 (±2.6)	p= 0.000
No intoxicados (SpCO≤ 15)	3.4 (±2.7)	1.9 (±1.9)	p= 0.000
Intoxicados (SpCO > 15)	16 (±0.0)	23.2 (±7.8)	p= 0.48

Se eligió el mes de febrero de 2013 porque en el análisis retrospectivo de los diez años anteriores nuestro grupo observó que ese era el mes de mayor número de casos, con 13 intoxicaciones en los 10 años, seguido de noviembre y enero con 12 y 11 casos respectivamente [13].

Si bien es cierto que la determinación de los niveles de COHb en sangre arterial es más fiable que la no invasiva utilizada en el estudio, también lo es que la primera, además de dolorosa, no está exenta de riesgos y plateaba serios problemas éticos, de procedimiento y también de recursos (1501 punciones arteriales en el mes de estudio).

Pero además, la no invasiva presenta alguna destacada ventaja, al poder realizarse de forma rápida [23], en área e triaje del Servicio de Urgencias [14], lugar de primer contacto del paciente con el personal sanitario, evitando demoras en la medición de la COHb, como sucedería mediante su determinación en sangre, disminuyendo significativamente la probabilidad de falsos negativos.

El equipo utilizado, The Masirno Rainbow SET ® Rad 57 Pulse CO-Oximeter, fue declarado por la FDA como sólido equivalente a la CO-oximetría no invasiva, mostrando una precisión de ± 3%, en 1 desviación estándar, entre 0-40%, cuando se comparó con la medición invasiva de CO-Oximetría en sangre de voluntarios adultos sanos, en 452 muestras de 160 pacientes de diferente edad, género, peso y color de piel [18].

Otros destacados investigadores analizaron el comportamiento del Rad 57 comparando los resultados obtenidos con los encontrados con los métodos analíticos de referencia.

Barker et al [24], estudiaron a diez voluntarios sanos a los que hicieron respirar una mezcla de 21% de oxígeno, 79% de nitrógeno y 500 ppm de CO, hasta que sus cifras de CO alcanzaron el 15%. Los voluntarios tenían canalizada la arteria radial y varios sensores digitales Rad 57. Mientras respiraban el CO e iban ascendiendo sus cifras de CO, fueron sometidos a extracciones periódicas sangre, cada 10 minutos, desde la cánula radial para ser analizada en diferentes cooxímetros de laboratorio y poder comparar las cifras obtenidas con las del Rad 57.

Encontraron que el error sistemático médio (Bias) fue de -1.22% con una precisión del 2.2% y un coeficiente de correlación medio de los diez pacientes de R= 0.867, siendo esta correlación mayor de 0.9 en siete de los diez pacientes estudiados.

Este tipo de pulsi-cooximetros también fueron estudiados en la medicina práctica, en diferentes contextos clínicos, con la intención de analizar su precisión y exactitud al compararlos con la COHb obtenida por analítica sanguinea. En la Tabla 3 se muestran los hallazgos descritos por los principales investigadores, con resultados variables, algunos de ellos justificables como el de Suner, que reportó un tiempo medio de diferencia entre la medición del SpCO y la extracción de sangre venosa para el análisis de COHb de 67 minutos (IC 95%: 53.1-81.3), que sin lugar influyeron en la precisión obtenida. No obstante, obtuvieron un buen coeficiente de correlación entre SpCO y COHb (r= 0.72).

Roth et al tan solo incluyeron en su estudio a aquellos pacientes en los que las diferencias entre ambas medidas fueran menores de 60 minutos (1578 pacientes), aunque quizá continúe siendo demasiado tiempo para analizar parámetros como la precisión o el error sistemático.

Tabla 3. *Resultados de diferentes estudios comparando cifras de SpCO con COHb*

Autores	Año	Escenario	Número de sujetos	Bias (%)	Precisión (%)
Mottram et al [25]	2005	Servicio de neumología	31	2	1.8
Coulangue et al [26]	2008	Servicio de urgencias	12	-1.5	2.5
Kot et al [27]	2008	Centro de medicina hiperbárica	49	0.5	4.3
Piatkowski et al [28]	2009	Centro de quemados	20	3.2	2.4
Suner et al [7]	2008	Servicio de urgencias	64	-4.2	5.9
Touger et al [29]	2010	Servicio de urgencias	120	1.4	6.5
Roth et al [8]	2011	Servicio de urgencias	1578	2.9	3.2

Por otro lado, Touger tan solo estudió a los pacientes en los que se sospechaba de intoxicación por CO, lo que no representa la población general de pacientes que acuden al servicio de urgencias.

Todas estas dificultades metodológicas hacen que no podamos ser muy concretos al hablar de la precisión del Masirno Rainbow SET ® Rad 57 Pulse CO-Oximeter. Por ello, sabiendo que las características técnicas del Rad 57 especifican que tiene una precisión del ± 3% para el 68% de la población, o una desviación standard, nosotros utilizamos como criterio para el diagnóstico 2 desviaciones standard que incluyeran al 95% de la población, con lo que se pierde en precisión, que ahora sería del 5.9%, pero se gana en seguridad. De este modo, las cifras de SpCO menores o iguales a 15% podrían ser falsos positivos, pero las mayores de 15% serían verdaderos positivos con una $p < 0.05$.

También cabe destacar que se evitó el registro de otras variables para impedir la interferencia del estudio con la actividad clínica en la zona de triaje. Por ello, tampoco se registró la edad de los pacientes, motivo por el cual se consideraron como criterio de intoxicación cifras de COHb iguales o mayores al 10%, también en los niños. Este criterio puede minusvalorar el número real de intoxicados del estudio, al considerarse criterio diagnóstico de intoxicación en niños cifras de COHb mayores de 2.

Discusión de los resultados

La amplia muestra aleatoria de 1501 pacientes, de los 2694 de la población de estudio, representa el 55.7% de esta y permite que los porcentajes obtenidos puedan ser inferidos a ella con una precisión de ± 0.34% y un nivel de confianza del 95%.

El volumen de fumadores de la muestra, del 25%, fue concordante con el descrito en estudios relativos a la prevalencia del tabaquismo en España (30) y en Galicia [31].

Encontramos cifras medias de SpCO de 2,43% (±2,85), algo menores que las de Suner, de 3,60% (±3.3), aunque en su muestra había más fumadores (32%) lo que puede justificar la diferencia. Los valores de SpCO registrados por Suner oscilaron entre un mínimo del 0% y un máximo del 33%, semejante a los encontrados en nuestros pacientes que oscilaron entre el 1% y el 35%.

Suner et al, al igual que nosotros, encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de SpCO entre fumadores (5.2%) y no fumadores (2.9%) (7). En nuestro estudio fueron de 3.5% (±2.8) versus 2% (±2.6) respectivamente.

Los diez pacientes con cifras de SpCO mayores del 15% detectados en la muestra representan el 0.7% (± 0.34 $p< 0.05$) de las urgencias atendidas, con lo que se puede estimar que en la población de estudio el volumen de pacientes intoxicados se situaría en torno a los 18 casos (Tabla 4), lo que traduce una cifra significativamente superior a las intoxicaciones advertidas detectadas en los 10 años anteriores: 1.3 casos anuales (DS: 2.8) [13].

Tabla 4. *Pacientes intoxicados esperados para la población de estudio*

SpCO	Número de casos de la muestra	Porcentaje de urgencias (%)	Intervalo de confiazna (±0.34 %)	Número de casos esperados para la población de estudio	Número de casos esperados: menor y mayor en población de estudio
> 15	10	0.7	0.3-1.0	18	8.8-27.1

Diferentes investigadores han advertido de la existencia de un elevado volumen de intoxicaciones inadvertidas y las dificultades metodológicas para establecer su incidencia real [20,32,33]. Utilizando la pulsi CO- oximetría como método de screening de intoxicaciones inadvertidas Sunner et al [7] detectaron que de 28 casos diagnosticados de intoxicación por CO, once (39.3%) eran ocultos, entendiendo como tal cifras de SpCO mayores de 8% en no fumadores o de 12% en fumadores.

Cifras mucho mayores fueron detalladas por Roth et al [8], que encontraron que de 1578 pacientes que fueron evaluados en un servicio de urgencias mediante determinación de SpCO y COHb en sangre, con un intervalo de tiempo entre ambas determinaciones menor de una hora, 17 fueron diagnosticados de intoxicación por CO, lo que supuso el 1.1% de las urgencias atendidas.

Otros autores como Nilson et al describieron, en el entorno pre-hospitalario, registros de SpCO mayores del 15% en el 1.1% de sus evaluaciones [9].

Por todo lo comentado, se puede concluir afirmando que el volumen de intoxicaciones inadvertidas en el Área Sanitaria do Salnés es elevado, mucho mayor que el de las realmente detectadas, pudiendo llegar a representar entre ambas el 0.7% (± 0.34% $p< 0.05$) de las urgencias atendidas en los meses fríos, de alta prevalencia de intoxicaciones por CO.

Bibliografía

1. Nogué Xarau S, Dueñas Laita A (2005) Monóxido de carbono: un homicida invisible y silencioso. Med. Clínica. 124 (8): 300–301
2. Gómez J, Valcarce F (2003) Tóxicos detectados en muertes relacionadas con fuegos e intoxicaciones por monóxido de carbono. Rev. Toxicol. 20 (1): 38–42
3. Sección de Toxicología Clínica. Asociación Española de Toxicología. Infomes 2004-2008 del Sistema de Toxicovigilancia. http://wzar.unizar.es/stc/toxicovigilancia/toxicovigilancia.html
4. Oliu G, Nogué S, Miró Ò (2010) Intoxicación por monóxido de carbono: claves fisiopatológicas para un buen tratamiento. Emergencias 22 (6): 451-59
5. Harper A, Croft-Baker J (2004) Carbon monoxide poisoning: undetected by both patients and their doctors. Age Ageing. 33 (2) :105–9
6. Robles MDM, Carreira JMF, Suárez IG, Diéguez OF, Torres GR (2009) Evolución epidemiológica de las intoxicaciones agudas por gases tóxicos atendidas durante el periodo de 2004 a 2007 en urgencias de un hospital comarcal. Emergencias 21 (5): 350–53
7. Suner S, Partridge R, Sucov A, Valente J, Chee K (2008) Non-invasive pulse co-oximetry screening in the emergency department identifies occult carbon monoxide toxicity. J. Emerg. Med. 34 (4) :441–50
8. Roth D, Herkner H, Schreiber W, Hubmann N, Gamper G (2011) Accuracy of noninvasive multiwave pulse oximetry compared with carboxyhemoglobin from blood gas analysis in unselected emergency department patients. Ann. Emerg. Med. 58 (1): 74–79

9. Nilson D, Partridge R, Suner S, Jay G (2010) Non-invasive carboxyhemoglobin monitoring: screening emergency medical services patients for carbon monoxide exposure. Prehosp Disaster Med. 25 (3) :253–56

10. Castañeda M, Escoda R, Nogué S, Alonso JR, Bragulat E, Cardellach F (2008) Síndrome coronario agudo por intoxicación con monóxido de carbono. Rev. Toxicol. 25 (1-3): 69–72

11. Nogué Xarau S (2014) Toxicovigilancia y servicios de urgencias. Emergencias. 25 (6): 421-22

12. Muñoz JLD-M, Borobia A, Quintana M, Martínez-Virto A, Frías J, Carcas AJ (2013) Desarrollo y validación de un programa de toxicovigilancia con detección automatizada de casos en un hopital terciario (sat-hulp). Emergencias. 25 (6): 423–29

13. Manuel J. Vázquez Lima (2013) Intoxicaciones advertidas y ocultas por monóxido de carbono en el Área Sanitaria do Salnés. Santiago de Compostela. 279 pp.

14. Bermejo RS, Fadrique CC, Fraile BR, Centeno EF, Cueva SP, De las Heras Castro E(2013)El triaje en urgencias en los hospitales españoles.Emergencias25(1):66–70

15. Sánchez-Bermejo R (2015) Encuesta a los profesionales de enfermería españoles sobre el triaje en los servicios de urgencias hospitalarios. Emergencias. 27: 98–103

16. González EC, Lima MV, Masid MD, Alvarez CA, Guerra FS (2013) Validez del sistema de triaje manchester en la predicción del volumen de transportes e ingresos en un servicio de urgencias de un hospital comarcal. Emergencias 25 (3): 191–95

17. Rodríguez CÁ, Lima MJV (2015) La pulsicooximetría en el ámbito prehospitalario. Emergencias. 27: 9–10

18. Food and Drug Administration. K042546-Masimo Rainbow SET Rad 57 pulse COoximeter. Summary. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf4/K042536.pdf

19. Ruckman, Jared S (2011) A comparative studyof total hemoglobin measurament technologhy noninvasive pulseco-oximetry and conventional methods. University of Connecticut. 98 pp.

20. Nikkanen H, Skolnik A (2011) Diagnosis and management of carbon monoxide poisoning in the emergency department. Emerg. Med. Pract. 13(2):1

21. Yarar C, Yakut A, Akin A, Yildiz B, Dinleyici EC (2008) Analysis of the features of acute carbon monoxide poisoning and hyperbaric oxygen therapy in children. Turk J Pediatr. 50(3):235–41

22. Zaragozano JF, Estupiñá CF, Espatolero PA, Dufol A F, López JO (2005) Intoxicación por monóxido de carbono. Anales de Pediatría. 62 (6): 587-590

23. Sequera V-G (2015) Experiencia del uso del pulsicooxímetro en la evaluación prehospitalaria de las víctimas expuestas al humo de incendios en ambientes cerrados en cataluña. Emergencias. 27:23–26

24. Barker SJ, Curry J, Redford D, Morgan S (2006) Measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin by pulse oximetry: a human volunteer study. Anesthesiology. 105(5):892–97

25. Mottram C, Hanson L, Scanlon P (2005) Comparison of the masimo rad 57 pulse oximeter with spco technology against a laboratory co-oximeter using arterial blood. Respir Care. 50:1471

26. Coulange M, Barthelemy A, Hug F, Thierry A, De Haro L (2008) Reliability of new pulse co-oximeter in victims of carbon monoxide poisoning.

27. Kot J, Sićko Z, Goralczyk P (2008) Carbon monoxide pulse oximetry vs direct spectrophotometry for early detection of co poisoning]. Anestezjol. Intensywna Ter. 40 (2): 75

28. Piatkowski A, Ulrich D, Grieb G, Pallua N (2009) A new tool for the early diagnosis of carbon monoxide intoxication. Inhal. Toxicol. 21(13): 1144–47

29. Touger M, Birnbaum A, Wang J, Chou K, Pearson D, Bijur P (2010) Performance of the rad-57 pulse co-oximeter compared with standard laboratory carboxyhemoglobin measurement. Ann. Emerg. Med. 56 (4): 382–88

30. De la Iglesia BA, Marrón HO, Cerezuela ES, Pallarés JT (2006) Epidemiología del tabaquismo: efectos sobre la salud, prevalencia de consumo y actitudes. estrategias de prevención y control. Prev Tab. 1: 2–10

31. Pérez-Ríos M, Santiago-Pérez MI, Malvar A, Hervada X (2012) Respuesta a «cambios en la prevalencia del tabaquismo en los adolescentes en españa». Aten. Primaria. 44 (6): 370

32. Guzman JA (2012) Carbon monoxide poisoning. Crit. Care Clin. 28 (4): 537–48

33. Prockop LD, Chichkova RI (2007) Carbon monoxide intoxication: an updated review. J. Neurol. Sci. 262 (1): 122–30

Prácticas de Salud Ocupacional y niveles de biomarcadores séricos en aplicadores de plaguicidas de cultivos de arroz en Natagaima-Tolima, Colombia.

López K, Pinedo C and Zambrano M*

Universidad Militar Nueva Granada. Carrera 11 Nº 101-80, Bogotá, Colombia.

Resumen: Los pequeños agricultores de arroz del sector informal en Colombia son una población vulnerable a la intoxicación aguda y crónica por plaguicidas, especialmente porque no han sido incluidos en programas nacionales de capacitación, vigilancia y control de intoxicaciones. El objetivo de este estudio fue identificar mediante una encuesta el estado de cumplimiento de las prácticas de salud ocupacional y disposición adecuada de residuos de plaguicidas en un grupo de agricultores del municipio de Natagaima en Colombia y evaluar el nivel de biomarcadores séricos de efecto por exposición a plaguicidas en esta población. Los resultados muestran un panorama en donde prevalece una aparente percepción del riesgo por el uso de plaguicidas, pero hay una gran carencia de prácticas de salud ocupacional en la población que los manipula. El análisis de los biomarcadores séricos permitió detectar un aumento significativo en los niveles de aspartato amino transferasa, creatinina y ácido úrico y descenso de los niveles de colinesterasa sérica demostrando posibles alteraciones subclínicas de la función renal y hepática en la población estudiada.

Palabras clave: plaguicidas, toxicidad, ocupacional, enzimas séricas, biomarcadores.

Abstract: Safety practices and serum biomarkers levels in pesticide sprayers of rice crops in Natagaima-Tolima, Colombia.

Small rice farmers in the informal sector in Colombia are vulnerable to acute and chronic pesticide poisoning , especially because they have not been included in national training, monitoring and control programs to prevent poisoning. The aim of this study was to identify the state of compliance of occupational health practices and proper disposal of pesticide residues in a group of farmers in the municipality of Natagaima Colombia and to assess the level of serum effect pesticides biomarkers in this population. The results show a scenario where not only there is an apparent prevailing perception of risk by the use of pesticides, but also there is a lack of practice of occupational health practices in the population. Analysis of serum biomarkers allowed us to detect significant increase in the levels of aspartate aminotransferase, creatinine and uric acid and decreased levels of serum cholinesterase showing possible subclinical alterations of renal and liver function in the studied population.

Keywords: pesticides, toxicity, occupational, serum enzymes, biomarkers.

Introducción

En Colombia, el uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura y la falta de implementación de buenas prácticas agrícolas en los aplicadores generan un gran impacto tanto en el ecosistema como en la población. Para regular el uso indiscriminado de plaguicidas, las entidades nacionales y regionales han intervenido con programas y normas con el fin de mejorar las actividades agrícolas intentando reducir los impactos generados, sin embargo, el uso de plaguicidas sigue siendo elevado, principalmente en cultivos de arroz, plátano, banano, papa y algodón [1, 2]. El cultivo de arroz representa uno de los primeros lugares en uso de plaguicidas en Colombia. En general para el cultivo del arroz se utilizan 34 herbicidas, 30 insecticidas y 30 fungicidas, con dosis de aplicación que van desde 0.3 hasta 8 L de plaguicida líquido y de 15 g a 25 kg de producto sólido por hectárea [3]. El Tolima es uno de los departamentos con mayores áreas de arroz sembradas en Colombia, participando con un 74% del área total nacional, dentro de este departamento, se encuentra el municipio de Natagaima el cual para el año 2007 generó el 1,32% de la producción de arroz del Tolima y contó con 41 productores en un total de 1.420 hectáreas de producción de arroz [3].

En Sur América, la falta de estándares de seguridad, mínimo uso de elementos de protección personal, deficiencia de facilidades sanitarias y falta de programas de educación e información son responsables de un elevado número de intoxicaciones y muertes a causa de plaguicidas [4,5], adicionalmente, los agricultores realizan aplicaciones con equipos de protección personal insuficientes o inapropiados [6] y las prácticas de salud ocupacional y buenas prácticas agrícolas son ineficientes [7].

Colombia se rige bajo la Norma Andina [8] para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola. La Norma Andina se basa en los principios establecidos en el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) tomando como referencia la última clasificación toxicológica de plaguicidas recomendada por la Organización Mundial de la Salus (OMS) (Decisión 436, CAN) en la cual está la Clase Ia: Extremadamente peligrosos, Clase Ib: Altamente peligrosos, Clase II: Moderadamente peligrosos y Clase III: Ligeramente peligrosos [9].

Sustancias potencialmente tóxicas como los plaguicidas muestran un amplio espectro de efectos biológicos en el humano y su uso indiscriminado con fines agrícolas puede dar origen a potenciales complicaciones neurológicas y hematológicas en los individuos afectados [10] incluyendo hematotoxicidad moderada a severa y aumentando el riesgo de enfermedades medulares degenerativas, especialmente hipoplasia medular en humanos [10] y de efectos adversos en la salud como cáncer, defectos reproductivos, anormalidades neurocomportamentales, y toxicidad endocrina e inmunológica [11]. Adicionalmente, la exposición excesiva a plaguicidas causa cambios en biomarcadores hepáticos y renales, siendo estos biomarcadores, de gran utilidad para el monitoreo de los efectos adversos de plaguicidas en la salud de los trabajadores [12]. A nivel mundial diferentes trabajos han estudiado los cambios bioquímicos en trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas [12]. Adicionalmente, en Colombia no hay ningún registro bibliográfico sobre medición de biomarcadores séricos diferentes a la colinesterasa en población agricultora expuesta a plaguicidas.

El objetivo de este estudio fue analizar las prácticas de salud ocupacional de una población de cultivadores de arroz en Natagaima, Tolima y determinar posibles alteraciones de salud derivadas de su ocupación, mediante la medición de colinesterasa y otros biomarcadores séricos.

Material y métodos

Se realizó un estudio observacional de corte transversal en 38 individuos con exposición ocupacional a plaguicidas y una población control de 45 individuos residentes de la misma zona. La población

*e-mail: maira.zambrano@unimilitar.edu.co

expuesta evaluada corresponde al 43% de los agricultores de cultivos de arroz ubicados en el municipio de Natagaima. Tanto la población expuesta como la población control estaba conformada por hombres entre 24 y 78 años de edad. Los individuos expuestos pertenecen a grupos de pequeños agricultores de las comunidades indígenas "Pijaos"," Coyaimas" y "Natagaimas". Este estudio fue aprobado por el comité de Bioética del Hospital Municipal de Natagaima previa firma de un documento de consentimiento informado por parte de cada uno de los participantes.

Criterios de inclusión de la población y encuesta

La población agricultora y población control fue contactada a través de la alcaldía municipal de Natagaima quienes cuentan con la base de datos de los aplicadores de plaguicidas de cultivos de arroz de ese municipio y también permitieron contactar a los individuos del grupo control. Se realizó una encuesta en el grupo control y otra en el grupo expuesto basada en modelos de la GTC45 [13], decreto 1843 de 1991 [14] y CDC-NIOSH [15] sobre datos demográficos, edad, peso, consumo de alcohol, tabaco y drogas psicoactivas, historial médico, historial ocupacional y tipo de actividad laboral. Para el grupo de agricultores, la encuesta contenía preguntas específicas sobre el tipo de actividad agrícola, plaguicidas utilizados, uso de elementos de protección personal y capacitación en aplicación de plaguicidas. Se eliminaron los individuos con patologías crónicas como diabetes mellitus, hipertensión, insuficiencia renal y hepatitis.

Recolección de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron recolectadas en el Hospital municipal de Natagaima por punción venosa utilizando tubo separador de suero (SST, Vacutainer ®) de 5 ml en individuos con ayuno entre 10-12 horas. El suero fue separado mediante centrifugación a 1000 g por 10 minutos y almacenado a 4ºC hasta su procesamiento en los laboratorios de la Universidad Militar Nueva Granada en Bogotá, Colombia. Para todas las pruebas, se tuvieron en cuenta los tiempos de estabilidad de los analitos en las muestras refrigeradas.

Análisis bioquímicos

Para la cuantificación de colinesterasa sérica se realizaron tres mediciones utilizando muestras tomadas con intervalos de un mes con el fin de detectar descenso de la actividad de la enzima. Para los demás biomarcadores, se utilizó solo una muestra. Los análisis bioquímicos en las muestras de suero se llevaron a cabo utilizando kits y sueros control BioSystems® y Wiener lab ® en el equipo semiautomatizado BTS 350 BioSystems® . Los biomarcadores hepáticos alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamiltransferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (FAL) se cuantificaron utilizando los métodos IFCC (Intenational Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), los biomarcadores renales creatinina y ácido úrico con los métodos picrato alcalino y uricasa respectivamente, la colinesterasa sérica utilizando el método butiriltiocolina y la lactato deshidrogenasa mediante el método piruvato.

Análisis estadístico

En los análisis estadísticos se empleó el software R (versión 3.0.3). La comparación de biomarcadores entre los grupos fue realizada mediante la prueba t de Student cuando las variables presentaban distribución normal. En caso contrario, se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. La distribución normal de los datos se verificó por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. Igualmente, se determinó la asociación entre los diversos síntomas y la exposición a plaguicidas usando la prueba exacta de Fischer para tablas de contingencia 2x2. Un valor P inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Prácticas de salud ocupacional

Tanto la población expuesta a plaguicidas como la población control estaba conformada por hombres nativos de Natagaima-Tolima y sus rangos de edad variaban entre los 24 a 78 años de edad. Se convocó mediante contacto con la alcaldía municipal a todos los aplicadores de plaguicidas de Natagaima a participar en el estudio y se realizó contacto con 40 cultivadores de los cuales finalmente participaron 38 individuos de un total de 41 cultivadores de arroz registrados en Natagaima según el último censo arrocero disponible.

Los síntomas más comunes reportados por la población expuesta fueron en orden descendente visión borrosa 77% (n=29), lagrimeo, sudoración profusa y dolor muscular 61% (n= 23), irritación ocular 55% (n=21), pérdida de la memoria 50% (n=19), rigidez muscular 44% (n=16), dolor de cabeza y picazón en la piel 38% (n=14). Otros síntomas menos comunes como desvanecimientos, salivación, vómitos, conjuntivitis, eritema, tos y dificultad para respirar se reportaron en el 22% (n=8). El consumo de alcohol y cigarrillo se reportó en el 11% (n=4). Además, se encontró asociación significativa entre el lagrimeo y la exposición a plaguicidas (p=0,043). Es decir, la proporción de individuos con lagrimeo difiere entre ambos grupos (expuesto y control), siendo los casos de lagrimeo mayores a causa del uso de plaguicidas. Para los demás criterios recopilados, no se logró establecer una asociación significativa entre la exposición y la presencia o ausencia del síntoma.

Los plaguicidas más usados por la población son insecticidas y herbicidas de los grupos de organofosforados, carbamatos y piretroides, siendo los ingredientes activos más comunes fention y fipronil y menos comunes furadan, glifosato, clorpirifos, picloram, bentazón, cipermetrina y malation (Tabla 1). Las cantidades aplicadas varían desde 50- 450 kg/ha de producto sólido y entre 1-4 L de producto líquido por hectárea.

Tabla 1. *Plaguicidas usados por los agricultores en Natagaima-Tolima, Colombia.*

Ingrediente activo	Clase toxicológica	% de agricultores
Fention	II	52% (n=19)
Fipronil	II	21% (n=8)
Furadán	Ia	15% (n=6)
Glifosato	III	15% (n=6)
Clorpirifos	II	10% (n=4)
Picloram	II	10% (n=4)
Bentazon	II	5% (n=2)
Cipermetrina	Ib	5% (n=2)
Malation	II	5% (n=2)

El 72% (n=27) de la población nunca recibió capacitación en aplicación, almacenamiento ni riesgos asociados con el uso de plaguicidas ni en el uso de elementos de protección personal. Ningún agricultor está certificado por algún ente educativo en la aplicación de plaguicidas ni posee el carnet de aplicador de plaguicidas según lo establece la normatividad colombiana.

Respecto al uso de elementos de protección personal, se encontró que solo el 11% (n=4) utiliza todos los elementos de protección personal, siendo lo más común en el 28% (n=10) de la población el uso de botas de caucho, gorro, pañuelo como protección respiratoria y una bolsa para cubrir la espalda. Los elementos de protección personal más usados son el gorro y las botas en el 94% (n=35) de la población y los menos usados son el mono de trabajo en el 17% (n=6), guantes en el 22% (n=8) y gafas en el 44% (n=16). Como justificación a no usar los elementos de protección personal el 44% (n=16) piensa que es por incomodidad, el 28% (n=10) por factores económicos, el 17% (n=6) desconocen la importancia de estos elementos y el 6% (n=2) creen que no tienen una utilidad aparente.

El 89% (n=28) de los agricultores reportó leer e identificar la etiqueta del plaguicida, el 72% (n=27) reconoce el riesgo de los plaguicidas en la salud, el 83% (n=31) reconoce que pueden ser dañinos para el ambiente y el 78% (n=29) reconoce que pueden afectar a los animales. El 100% (n=32) de la población almacena el producto fuera de su casa

y solo el 28% (n=10) desecha los recipientes de acuerdo con la normatividad local. Todos los aplicadores reconocieron estar conscientes del riesgo de desechar los residuos de plaguicidas o de hacer lavados de los equipos de fumigación cerca de cuerpos de agua o quebradas y manifiestan hacer estas actividades "fuera del hábitat" es decir dejando estos desechos sobre terrenos lejanos a los ríos y quebradas.

En cuanto a medidas de higiene durante y después de las aplicaciones de plaguicidas el 6% (n=2) reportó consumir alimentos durante la fumigación, el 22% (n=8) consume bebidas, el 89% (n=33) lava su ropa de trabajo en casa y el 89% (n=33) toma una ducha al finalizar la aplicación. Respecto al historial de incapacidades laborales, el 44% (n=14) manifestó haber suspendido labores por malestar durante la aplicación al menos una vez, el 28% (n=10) haber acudido al médico al menos una vez por esta razón y al 84% (n=31) nunca se les ha realizado algún examen de sangre como parte de programas preventivos de intoxicación con plaguicidas. A ninguno de los agricultores se les ha realizado alguna vez la medición de colinesterasa eritrocitaria o colinesterasa sérica.

Cambios en los niveles de biomarcadores séricos

Se encontró una disminución significativa de los niveles de colinesterasa sérica, y un aumento significativo de los niveles de AST, creatinina y ácido úrico en el grupo de aplicadores de plaguicidas con respecto al grupo control ($p< 0,05$). Los biomarcadores ALT, GGT, LDH y ALP no mostraron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. *Análisis estadístico de niveles de biomarcadores séricos en la población de agricultores versus la población control de Natagaima-Tolima, Colombia. Para la colinesterasa sérica se tuvieron en cuenta los valores de una de las tres mediciones realizadas.*

Biomarcador	Control	Expuesto	Valor p
ALT (U/L)	24,2 (+/- 5,6)	25,2 (+/- 13)	0,854
AST (U/L)	30,2 (+/- 3,4)	46,9 (+/- 17,5)	0,046*
GGT (U/L)	22 (14,5-31)	24 (20-31)	0,589
Ácido úrico (mg/dL)	4,33 (4,00-4,61)	5,65 (5,34-6,45)	0,036*
Creatinina (mg/dL)	0,85 (0,8-0,9)	1,1 (1-1,3)	0,036*
LDH (U/L)	320,5 (+/- 102,3)	377 (+/- 75,2)	0,369
ALP (U/L)	62 (+/- 31,9)	69,2 (+/- 25,6)	0,707
Colinesterasa sérica (U/L)	8314 (+/- 1296)	5810 (+/- 1165)	0,019*

*Diferencias significativas

Discusión

Se pudo evidenciar la gran deficiencia en el uso de elementos de protección personal en los aplicadores de plaguicidas quienes frecuentemente utilizan únicamente gorro y botas de caucho. El uso de los demás elementos de protección personal como guantes, gafas, respirador y mono de trabajo es reducido. Como principal justificación de los agricultores a este comportamiento está la incomodidad física o incomodidad térmica al usar estos elementos y además los altos costos de los mismos tal y como se ha reportado en otros estudios [5, 16]. Sin embargo, se sabe que hay una alta influencia de las normas sociales en las comunidades de agricultores que estarían perjudicando en la deficiencia de uso de elementos de protección personal [17] como por ejemplo la percepción generalizada en la comunidad de que los elementos de protección personal son inútiles [17]. Los pequeños agricultores de las zonas rurales de los países en vía de desarrollo como Colombia, usualmente utilizan equipo de protección personal insuficiente o inadecuado y además tienden a utilizar plaguicidas innecesariamente o en exceso [5, 6], en este estudio se encontró que las cantidades de plaguicidas aplicados por los agricultores muchas veces superan las recomendaciones de las casas comerciales, encontrando casos en los cuales es hasta 5 veces superior a la cantidad recomendada. Durante el periodo en que se llevó a cabo esta investigación, los agricultores manifestaron estar en un periodo de alta incidencia de plagas y enfermedades en sus cultivos, razón por la cual solicitaron apoyo a la gobernación local para implementar aspersiones aéreas, al no obtener apoyo por parte de estos entes, manifiestan haber incrementado las cantidades de plaguicidas aplicadas en sus cultivos.

Los plaguicidas más utilizados por los agricultores son insecticidas organofosforados y piretroides de categoría toxicológica 2. Sin embargo, también se encontró el uso de carbofurán, un carbamato del grupo1a, el cual debido a su alta toxicidad ha sido restringido en E.E.U.U y la Unión Europea (EPA, Rotterdam Convention) [18, 19] pero que en la actualidad es usado en Colombia. A pesar de los esfuerzos internacionales por restringir los plaguicidas más peligrosos, se sabe que en países en donde los ingresos son bajos, los productos prohibidos son altamente utilizados [16].

La normativa colombiana establece que toda persona que aplique plaguicidas debe estar registrada y haber recibido capacitación teórico-práctica por parte de un ente educativo autorizado (Decreto 1843, 1991) [14]; sin embargo, ninguno de los agricultores encuestados recibió dicha capacitación ni tienen la certificación como "Aplicador de Plaguicidas". Dado que la mayoría de los cultivadores de arroz del Tolima son pequeños agricultores arrendatarios de las tierras que cultivan [3], es poco frecuente que reciban capacitaciones o que estén incluidos en programas de salud ocupacional.

El inadecuado manejo de las prácticas agrícolas en la población contrasta con la aparente percepción del riesgo por parte de los agricultores quienes en su mayoría manifiestan conocer los riesgos ambientales y para la salud humana asociados con la aplicación de plaguicidas. A pesar de manifestar su conciencia del riesgo, los agricultores no tienen conocimiento sobre prácticas de salud ocupacional como uso de elementos de protección personal, no comer o beber mientras hacen las aplicaciones o no llevar la ropa de trabajo

a casa, y no realizan la disposición adecuada de los recipientes contaminados incrementando así el riesgo de exposición a plaguicidas. Este comportamiento está documentado en otros estudios en donde se evidencia que los agricultores tienen algunos conocimientos del riesgo de los plaguicidas pero tienen un gran desconocimiento de las medidas específicas para prevenir exposiciones ocupacionales [20] y adicionalmente tienen dificultad en comprender la información de las etiquetas de los productos químicos que manipulan [21].

Los síntomas más comunes reportados por los agricultores como visión borrosa, pérdida de la memoria y dolor de cabeza, si bien hacen parte del síndrome muscarínico característico de la exposición a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa [22], también son bastante inespecíficos y podrían estar asociados con múltiples causas, adicionalmente en este estudio no se pudo establecer una relación significativa entre los síntomas mencionados anteriormente y la aplicación de plaguicidas. El lagrimeo reportado por el 61% (n=23%) de los agricultores si mostró estar relacionado estadísticamente con la aplicación de plaguicidas, este síntoma podría estar asociado con la falencia en el uso de gafas de seguridad durante la aplicación de los plaguicidas dada la característica irritante de muchos de estos productos. El 50% (n=19) de la población reportó pérdida de la memoria y aunque podría pensarse en múltiples causas, un factor de riesgo para trastornos neurodegenerativos como el déficit de la función cognitiva es la exposición crónica a dosis bajas de plaguicidas pues hay evidencia de que además de los efectos colinérgicos por exposición a organofosforados, hay otros mecanismos no colinérgicos asociados con exposiciones repetidas a bajas dosis de organofosforados como falta de atención y déficit de memoria [23, 24] además de efectos psicológicos agudos como ansiedad, depresión, irritabilidad ydificultad de concentración [25], hay evidencias de estudios epidemiológicos que muestran la posible relación entre la exposición a determinados plaguicidas y la neurodegeneración

cerebral, sin embargo los resultados de estos estudios no son definitivos [26].

La población agricultora expuesta a plaguicidas mostró elevación significativa en los niveles de AST, creatinina y ácido úrico, sin embargo, a pesar de que los valores no fueron patológicos, estarían mostrando posibles alteraciones subclínicas de la función renal y hepática pues se ha reportado que las exposiciones crónicas a bajas dosis de plaguicidas pueden producir estos cambios bioquímicos aún antes de la manifestación de efectos clínicos y pueden afectar múltiples órganos incluyendo hígado y riñón y además que estos cambios pueden ser fácilmente detectados mediante la determinación de enzimas séricas y otros parámetros bioquímicos [12, 27, 28]. En la población de agricultores también se detectó una reducción significativa en los niveles de colinesterasa sérica comparado con el grupo control, dado lo anterior, hay que tener en cuenta que en el grupo expuesto el descenso de la actividad de la enzima nunca fue superior al 13% y por tanto no supera los límites biológicos establecidos por la OMS (30%) [29].

Si bien está ampliamente reportado en la literatura que la reducción de niveles de colinesterasa tanto eritrocitaria como sérica son indicadores de exposición a organofosforados [25,30], en este estudio solo se midieron los niveles de colinesterasa sérica y los resultados no mostraron niveles alarmantes de reducción de la actividad de esta enzima pues los valores nunca superaron el 13% de descenso en su actividad, a pesar de lo anterior, en Colombia los agricultores y fumigadores tienen una dinámica laboral en la cual están rotando constantemente por varios empleos en el sector agrícola y siempre están en contacto con los plaguicidas dificultando enormemente la obtención de los valores basales de colinesterasa [22], esta podría ser una de las razones para explicar que las cifras de reducción de actividad de la colinesterasa no reflejaran un marcado descenso a pesar de la exposición de la población a los plaguicidas inhibidores de la colinesterasa.

La población de agricultores estudiada pertenece a la zona arrocera centro de Colombia, caracterizada por una alta proporción de individuos indígenas mayores de 40 años los cuales son una población vulnerable a desarrollar toxicidad por exposición aguda o crónica a plaguicidas durante sus labores agrícolas ya que nunca han estado inmersos en programas preventivos de salud ocupacional ni buenas prácticas agrícolas.

Se hace necesaria la modificación de las estrategias nacionales de vigilancia de la intoxicación por exposición ocupacional a plaguicidas para que incluyan a los pequeños agricultores en programas integrales de salud pública realizando la medición de biomarcadores séricos como creatinina, ácido úrico, transaminasas y colinesterasa sérica, dado que la estrategia nacional actual de medición de la colinesterasa eritrocitaria (Decreto 1843 de 1991) [14] no es viable por ser una prueba no disponible en las zonas rurales de Colombia.

Colombia al igual que otros países latinoamericanos subdesarrollados muestra deficiencias en almacenamiento, desecho, uso de elementos de protección personal y uso de plaguicidas restringidos, todo esto dentro de un contexto social y económico que hace muy difícil la implementación de programas de vigilancia y control del uso seguro de plaguicidas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Militar Nueva Granada.

Bibliografía

1. Bonilla P, Peinado E y Urdaneta A (2000) Informe nacional sobre uso y manejo de plaguicidas en Colombia, tendiente a identificar y proponer alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe . REPCar (Reducing Pesticide Runoff of the Caribean Sea). http://*www.cep.unep.org/pubs/.../GEF.../Colombia%20Final%20Report.doc* [Consulta: 15 sept. 2014].
2. Buitrago C y Gómez M (2008) Uso aparente de plaguicidas en Colombia durante los años 2004-2007. REPCar (Reducing Pesticide Runoff of the Caribbean Sea). Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. República de Colombia. http://cep.unep.org/repcar/informacion-de-paises/colombia-1/COL%20importacion%20y%20exportacion%202004-2007.pdf [Consulta: 15 sept. 2013].
3. Federación Nacional de Arroceros (2008) Tercer censo nacional arrocero, Zona Centro.http://www.fedearroz.com.co/doc_economia/Censo%20III%20%20Centro%2012%20marzo%202008.pdf [Consulta: 22 oct. 2013].
4. Lesmes-Fabian C, García-Santos G, Leuenberger F, Nuyttens D y Binder CR (2012) Dermal exposure assessment of pesticide use: The case of sprayers in potato farms in the Colombian highlands. Science of the Total Environment. 430:202-208.
5. Feola G y Binder CR (2010) Why don't pesticide applicators protect themselves ? Exploring the use of personal protective equipment among Colombian smallholders. International Journal of Occupational and Environmental Health. 16:11-23.
6. Feola G y Binder CR (2010) Identifying and investigating pesticide application types to promote a more sustainable pesticide use. The case of smallholders in Boyacá, Colombia. Crop Protection. 29:612-622.
7. Ribeiro M, Colasso C, Monteiro P, Pedreira Filho W y Yonamine M (2012) Occupational safety and health practices among flower greenhouses workers from Alto Tiete region (Brazil). Science of the Total Environment.416:121-126.
8. Comisión de la Comunidad Andina, decisión 436, Norma Andina para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola (1996) http://www.oas.org/dsd/Quimicos/Documents/Sudamerica/decision%20436%20can.pdf [Consulta: 15 dic. 2013].
9. The WHO (World Health Organization) Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification (2010) http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf [Consulta: 9 sept. 2013].
10. Chatterjee S, Basak P, Chaklader M, Das PPereira J, Chaudhuri S y Law S (2013) Pesticide induced marrow toxicity and effects on marrow cell population and on hematopoietic stroma. Experimental and Toxicologic Pathology 65: 287-295.
11. Mrema E, Rubino F, Brambilla G, Moretto A, Tsatsakis A, Colosio C (2013) Persistent organochlorinates pesticides and mechanisms of their toxicity. Toxicology. 307:74-88.
12. Khan D, Bhatti M, Khan F, Naqvi S, Karam A (2008) Adverse Effects of Pesticide Residues on Biochemical Markers in Pakistani Tobacco Farmers. International Journal of Clinical and Experimental Medicine. 1: 274-282.
13. Guía Técnica Colombiana GTC 45. Guía Para la Identificación de los Peligros y la Valoración de los Riesgos en Seguridad y Salud Ocupacional. Icontec Internacional. Consejo Colombiano de Seguridad (2010) http://tienda.icontec.org/brief/GTC45.pdf [Consulta: 3 abr. 2013].
14. Ministerio de Salud. Decreto 1843 de 1991. Por la cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII Y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas. República de Colombia. www.andi.com.co/downloadfile.aspx?Id=18713cd9-8f65-4d46-9443 [Consulta: 17 abr. 2013].

15. Occupational Health of Hired Farmworkers in the United States. National Agricultural Workers Survey Occupational Health Supplement (1999) Department of Health and Human Service. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. CDC. NIOSH. http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-119/pdfs/2009-119.pdf [Consulta: 3 abr. 2013].

16. MacFarlane E, Carey R, Keegel T, El-Zaemay S y Fritschi L (2013) Dermal exposure associated with occupational end use of pesticides and the role of protective measures. Safety and Health at Work 4: 136-141.

17. Gomes J, Lloid OL, Revitt DM (1999) The influence of personal protection, environmental hygiene and exposure to pesticides on the health of inmigrant farm workers in a desert country. International Archives of Occupational and Environmental Health 72: 40-45.

18. Rotterdam Convention. Form for Notification of final regulatory action to ban or severely restrict a chemical (2012) http://ec.europa.eu/transparency/regexpert/index.cfm?do=groupDetail.groupDetailDoc&id=6572&no=8 [Consulta: 21 sept. 2013].

19. Environmental Protection Agency. Pesticides registration. Carbofuran I.R.E.D. (2007) Facts.http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/carbofuran_ired_fs.htm

20. Barraza D, Jansen K, van wendel de Joode B y Wesseling C (2011) Pesticide use in banana and plantain production and risk perception among local actors in Talamanca, Costa Rica. Environmental Research 111:708-717.

21. Oropesa A, Soler F y Haro M (2011) Estimación del grado de conocimiento sobre el riesgo químico en trabajadores de Badajoz. Revista de Toxicología 28:158-165.

22. Córdoba D. (2006) Inhibidores de colinesterasas en Toxicología. Editorial El Manual Moderno. Quinta Edición. Bogotá. Colombia. pp 139-161.

23. Baltazar M, Dinis-Oliveira R, Bastos M, Tsatsakis A, Duarte J, Carvalho C (2014) Pesticides exposure as etiological factors of Parkinsons disease and other neurodegenerative diseases - A mechanistic approach. Toxicology Letters. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.01.039.

24. Elena-Real C, Pasión Galván R, Pérez Artés M, Puerto M y Moreno I (2012) Posible contribución del paraquat al desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Revista de Toxicología 29:117-122.

25. Stallones L y Beseler C (2002) Pesticides Illness, farm practices, and neurological symptoms among farm residents in Colorado. Environmental Reasearch 90:89-97.

26. Martos A, Figueroa E, Ruggeri M, Giunta S, Wierna N, Bonillo M y Bovi M (2005) Diferencias en la ejecución cognitiva y actividades colinesterasa en adolescentes con exposición ambiental a plaguicidas en Jujuy (Argentina). Revista de Toxicología 22:180-184.

27. Wang H, Liang Y, Zhang Q, Long D, Li W, Li L, Yang L, Yang X, Wu Y (2011) Changes in metabolic profiles of urine from rats following chronic exposure to acetolcholinesterase pesticides. Pesticide Biochemistry and Physiology 101:232-239.

28. Hernández A, Gomez A, Perez V,Garcia-Lario J, Pena G, Gil F, López O, Rodrigo L, Pino G y Pla A (2006) Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agricultural farmers. Environmental Research 102:70-76.

29. Maroni M, Colosio C, Ferioli A y Fait A (2000) Organophosphorous pesticides. Toxicoloy 143: 9-37.

30. Yucra S, Steenland K, Chung A, Choque F y Gonzalez G (2006) Dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus in applicators of agricultural pesticides in Majes-Arequipa (Perú). Journal of Occupational Medicine and Toxicology 1:27.

Rev. Toxicol (2015) 32: 107-111

Ecotoxicity studies of antifungal metabolites of B*acillus* sp. IBA 33.

*Gordillo MA, Gomez RL, Navarro AR, Maldonado MC**

Instituto de Biotecnología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Ayacucho 465. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina

Abstract: The increments of plant diseases caused by the proliferation of fungicide-resistant pathogens intensified the research of new active metabolites against them. The study of biological methods as an alternative to chemical control has reach relevance in recent years. It has been suggested that the use of metabolites from *Bacillus*, is an alternative or supplementary method to chemical plant protection, if they are not toxic for the consumers and environmentally friendly. The toxicity of different concentrations of antifungal metabolites produced by *Bacillus* sp. IBA 33 was evaluated. Their ability to induce cytotoxic effects was investigated by different tests as hemolysis, and *Artemia salina* and *Allium cepa* L immobilization. With 2.56 mg/ml of antifungal metabolites hemolysis reached 24.07%, to 1.28 mg/ml was 14%. HC_{50} was 10.41 mg/ml. *A. salina* nauplii exposed to 3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml of antifungal metabolites showed 80, 20 and 10% of mortality respectively; LD_{50} was 2.24 mg/ml. In *Allium cepa* L test after 72 h of treatment, the roots lengths were 8.75, 10.35 and 23.75 mm with 3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml of antifungal metabolites respectively. The EC_{50} was 0.078 mg/ml. After 144 h the EC_{50} was 4.11 mg/ml. Only with 3.2 mg/ml of metabolites, chromosomal aberrations, cytoplasm vacuolization and decentralization of nuclei were observed in the cells of *Allium cepa* L. No micronuclei were detected. Under the experimental conditions, the antifungal metabolites concentrations assayed are considered non toxic.

Keywords: lipopeptides, hemolysis, *Artemia salina*, *Allium cepa* L., citotoxicity, ecotoxicity.

Resumen: Estudios de la ecotoxicidad de metabolitos antifúngicos de Bacillus sp. IBA 33.

El incremento de enfermedades de plantas causado por la proliferación de patógenos resistentes a fungicidas intensificó la investigación de nuevos metabolitos activos contra ellos. El estudio de métodos biológicos como una alternativa al control químico ha alcanzado relevancia en años recientes. Se ha sugerido que el uso de metabolitos de *Bacillus*, es una alternativa o un método suplementario a la protección química de las plantas, siempre y cuando ellos no sean tóxicos para los consumidores y sean amigables para el medio ambiente. Se ha evaluado la toxicidad de diferentes concentraciones de metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus* sp. IBA33. Se investigó su capacidad para inducir efectos citotóxicos mediante diferentes tests como hemólisis e inmovilización de *Artemia salina* y *Allium cepa* L. Con 2.56 mg/ml de metabolitos antifúngicos la hemólisis alcanzó 24.07%, para 1.28 mg/ml fue 14%. La HC_{50} fue 10.41 mg/ml. Nauplios de *Artemia salina* expuestos a 3.2; 1.6 y 0.8 mg/ml de metabolitos antifúngicos mostraron 80; 20 y 10% de mortalidad respectivamente después de 24 h de tratamiento; la LD_{50} fue 2.24 mg/ml. En el test de *Allium cepa* L después de 72 h de tratamiento, la longitud de las raíces fueron 8.75; 10.35 y 23.75 mm con 3.2; 1.6 y 0.8 mg/ml de metabolitos antifúngicos respectivamente, con una EC_{50} de 0.078 mg/ml. Después de 144 h la EC_{50} fue 4.11 mg/ml. Solamente con 3.2 mg/ml de metabolitos fueron observadas aberraciones cromosómicas, vacualización y descentralización de los núcleos en las células de *Allium cepa* L. No se observaron micronúcleos. Bajo las condiciones experimentales, las concentraciones de metabolitos antifúngicos ensayadas son consideradas no tóxicas.

Palabras claves: lipopéptidos, hemólisis, *Artemia salina*, *Allium cepa* L., citotoxicidad, ecotoxicidad.

*e-mail: cristimaldone@hotmail.com

Introduction

The greatest causes of loss in fruit industry are postharvest diseases by the proliferation of strains resistant to fungicides, resulted in the need to investigate new bio-fungicides with potential industrial application. Factors that contribute to the fungicide-resistant plant pathogens included the prolonged and occasional excessive use of synthetic agrochemicals. Overuse of chemicals fungicides causes several environmental problems.

Therefore, the search for alternatives to chemical control has reach importance in recent years. It has been suggested that the use of strains of the genus *Bacillus*, or their metabolites, may be an alternative or supplementary method to chemical plant protection [1].

Several species of bacteria are known for antifungal activity, *Bacillus* are a great choice because produce endospores (tolerant to heat and desiccation) [2]. Production of antifungal protein of *Bacillus* spp in the suppression of various diseases is a common phenomenon. These antifungal metabolites are usually polypeptides composed entirely of amino acids, but some may contain other residues like a fatty acid chain. These kinds of metabolites are named lipopeptides and there are three families of *Bacillus* lipopeptides; surfactins, iturins and fengycins [3]. Many microorganisms, particularly bacteria, release biosurfactants to their growth medium. The chemical nature of these compounds is rather heterogeneous, including glycolipides, lipoproteins and lipopeptides [4]. Lipopeptides as compared with synthetic fungicides are in general more selective, effective, stable and environmentally friendly with a number of very interesting andpromising technical applications [5]. Previous work demonstrated that *Bacillus* sp IBA 33 produces lipopeptides from iturins family with antifungal action against pathogens of postharvest disease of lemon fruits [1]. Lipopeptides application in products for human consumption, for instance, requires an accurate characterization of possible toxic effects.

The preliminaries tests applied to determine cytotoxicity are: hemolysis of red blood cells and mortality of *Artemia salina*, also the test of *Allium cepa* L. detects potentially genotoxic agents.

The aim of this paper was applied the cited methods to study the toxicity of the antifungal metabolites produced by *Bacillus* sp. IBA 33, according to the effective concentration (1.6 mg/ml), to control *G. citri-aurantii* in lemon fruits. These studies contribute to increase the knowledge to the safety of antifungal metabolites for the future use as a biocontroller.

Materials and Methods

Microorganism:

Bacillus sp. IBA 33 strain, producer of antifungal metabolites (AFM), was isolated from the soil of lemon plantations [6] maintained in Luria Bertani medium, transferred every 30 days and kept at 4ºC.

Antifungal metabolites:

AFM from *Bacillus* sp. IBA 33 were produced in Landy medium [1]. Three stock solutions of AFM were prepared in distilled water or saline water: 3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml.

Cytotoxicity assay:

Hemolysis:

Human erythrocytes were freshly prepared before the experiments from red blood cell concentrates. Cells were washed with buffer Tris-saline (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6) and finally suspended at a hematocrit of 26%. AFM was added from a 3.2 mg/ml stock solution in buffer Tris-saline pH 7.6 and then were diluted until 0.64 mg/ml. After 30 min at room temperature, the samples were centrifuged and the hemolysis was determined by measuring the absorbance of release hemoglobin at 540 nm. The total amount of hemoglobin was established by lysis of the erythrocytes with water plus NaCl 50% (positive control) [7]. As negative control of hemolysis, the erythrocytes were suspended in buffer Tris-saline pH 7.6. The results were expressed as hemolysis percentage.

Toxicity test on Artemia salina:

Artemia salina is a brine shrimp, an organism living in saline water. A little amount of eggs from *Artemia salina* (VitaFish) was cultured into saline water (2.5% NaCl). The culture was incubated at 30ºC, 200 rpm during 24 h. The freshly hatched individuals, called nauplii, are used for testing. 10 nauplii of *Artemia salina* were placing into Petri dishes with 6 mL of different concentrations of AFM suspended in saline water (3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml) at 30ºC without aeration. $K_2Cr_2O_7$ (20 mg/l) was used as positive control and saline water as negative control of toxicity. For each treatment three groups of 10 individuals were assayed. Mortality of nauplii was checked at 4, 8, 20 and 24 h.

Toxicity test on Allium cepa L.

Onion bulbs (*Allium cepa* L.) were scraped at the root and were place in 50 ml flasks, containing tap water during three days to promote the emergence of new roots until reached 15-20 mm in length. These bulbs were placed onto flasks filled with different concentrations of AFM (3.2; 1.6 and 0.8 mg/ml) at 25ºC. At 72 and 144 h the length of roots (mm) were measured. As positive and negative control were used $K_2Cr_2O_7$ (20 mg/ml) and tap water respectively. All solutions were renewed every 24 h. A series of three bulbs for each concentration and control groups were assayed.

Macroscopic parameters: Thereafter, the length of the whole root bundle was measured as described by Fiskesjo [8]. Were plotted the root length expressed as a percentage of the control against concentrations of AFM to estimate EC_{50} values. Other signs of toxicity such as changes in root consistency and color, the presence of tumors, hook and twisted roots were also, recorded as indicative of general toxicity

Microscopic parameters: Of each *Allium cepa* L. bulbs treated with the AFM during 48 h under the usual laboratory conditions described above, three root tips were used for the microscopic analysis to determine genotoxicity (mitotic index and the scoring of micronuclei and chromosome aberrations). At the end of the exposure period, the roots were fixed in ethanol-glacial acetic acid (3:1) and kept at 4ºC overnight. After hydrolysis during 15 min in 1N HCl were rinsed in distilled water. Then, only the meristematic region of the rootlets were fragmented, under microscope using histological needles, stained with 2% orcein-50% acetic acid. Microscope slides were prepared by squashing. The mitotic index was determined by scoring approximately 900–1000 cells per slide and was calculated as the ratio between the number of cells in mitosis and the total number of cells. The frequencies of micronuclei were analyzed by observing 1000 interphase cells for each bulb. Chromosome aberrations were characterized in 100 mitotic cells per slide and classified as stickiness and abnormal ana/telophases, which include bridges, vagrant chromosomes, chromosome missegration.

Data analysis: The data of roots lengths after 144 h of treatment were analyzed using Kruskal-Wallis test and ANOVA two ways, with repeat observations. Dunnett test was used for comparing several treatments groups with the negative control. The level of statistical significance was in all cases $p \leq 0.05$. IC_{50}, EC_{50} and HC_{50} value were calculated using the Nonlinear Curve Fit (DoseResp) with Origin 8.0 Pro software [$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(Log\ x0-x)*p})*$]. Each data point represents the arithmetic mean ± standard deviation (S.D.) of three independent experiments.

Results

Hemolysis

The AFM has been tested at different concentrations for its hemolytic activity. The results are given in Table 1. Indicating that at 2.56 mg/ml of AFM, the hemolysis reached 24.07%, to 1.28 mg/ml was 14.8%; with lower concentrations no hemolysis was observed. With positive control (NaCl 50%) and buffer Tris-saline pH 7.6 (negative control), the hemolysis was 100% and 0% respectively. Based on the results, we determined HC_{50} values, which is defined as the concentration of AFM that burst 50% of the red blood cells was equal to 10.41 mg/ml with R^2=0.93001 (Fig. 1).

Table 1. *Effect of different concentrations of AFM from Bacillus sp. IBA 33 on hemolysis.* ***Negative control:*** *Buffer Tris-saline pH 7.6.* ***Positive control:*** *NaCl 50%. The data are* expressed ± S.D.

AFM (mg/ml)	Hemolysis (%)
0.64	0*
0.96	0*
1.28	14.8 ± 0.65*
1.92	18.51 ± 2.66
2.24	20.37 ± 2.62
2.56	24.07 ± 2.60*
Negative control	0
Positive control	100

*Significative difference p>0.05

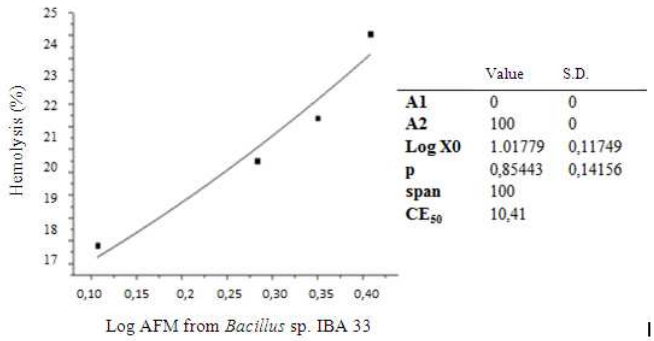


Fig. 1 HC_{50} obtained through the Dose-Resp analysis at 30 min of exposure of erythrocytes to different concentrations of AFM from *Bacillus* sp. IBA 33.

Toxicity on brine shrimp

The negative control (saline water) of *A. salina* nauplii registered 0% mortality after 24 h of treatment. *A. salina* nauplii exposed to 3.2, 1.6

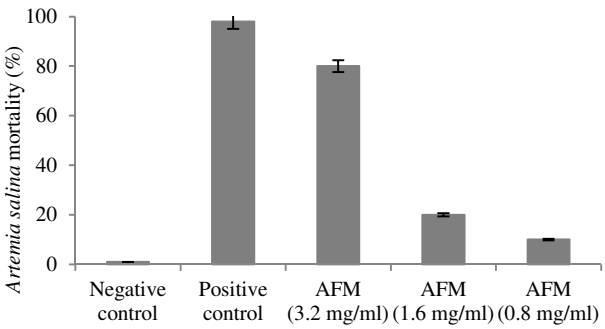


Fig. 2 Effect of different concentrations of AFM from *Bacillus* sp. IBA 33 on *Artemia salina* mortality (%). Negative control: Tap water. Positive control: $K_2Cr_2O_7$ 20 mg/l. Standard deviation is represented by the error bar on each point.

and 0.8 mg/ml of AFM showed 80, 20 and 10% of mortality respectively. The positive control registered 100% of mortality after the assay (Fig. 2). These results suggest that AFM showed a significant dose-dependent effect.

The data of nauplii mortality at 4 h of incubation have not significant differences with the three doses of AFM assayed (p= 0.1497). However, at 8, 20 and 24 h of AFM exposure show statistically significant differences (p<0.05) (Data not shown). When the survival of *Artemia* nauplii (3.2 mg/ml AFM) was compared with positive control no significant difference was observed (p=1).

With 1.6 and 0.8 mg/ml of AFM showed significant differences respect to positive control (p<0.05). When these concentrations were compared with negative control, the Kriskall Wallis analysis showed significant differences (p<0.05).

The level of AFM that produce a response in 50% of the population under study is known as LD_{50}, (lethal dose). LD_{50} was obtained from Fig. 3. The LD_{50} was 2.24 mg/ml with R^2=0.9596. The LD_{50} for $K_2Cr_2O_7$ was 12.5 mg/l [8].

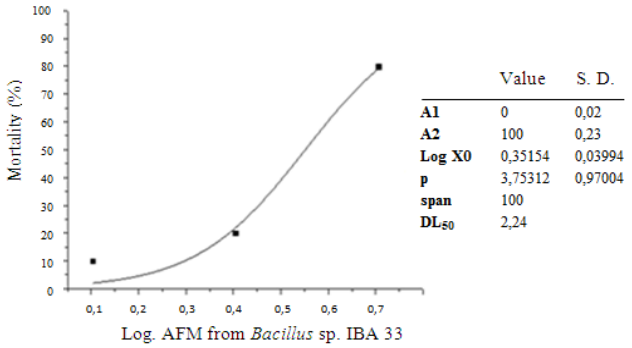


Fig. 3 LD_{50} obtained through the Dose-Resp analysis at 24 h of exposure of *Artemia salina* to different concentrations of AFM from *Bacillus* sp. IBA 33.

Toxicity on Allium cepa L.

No macroscopic changes were evident in growing roots under the three concentrations of AFM examined, the dichromate solution induced hook formation. The effect of AFM on root elongation of *A. cepa* L. bulbs is summarized in Table 2. After 72 h of treatment, the roots lengths were 8.75, 10.35 and 23.75 mm with 3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml of AFM respectively, and the control was 16.16 mm. After 144 h of treatment, the roots in the control had an average length of 44.41 mm. With 3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml of AFM the roots length reached 25.9; 36.73 and 49.79 mm (Table 2).

Table 2. Roots length (mm) after treatment with AFM from *Bacillus* sp. IBA 33**.** ***Negative control:*** tap water and ***Positive control:*** $K_2Cr_2O_7$ (20 mg/l). The data are expressed mean ± SD.

	Length (mm)	
	72 h	144 h
Negative control	16.16 ± 0.707	44.41 ± 4.563
Positive control	7.73 ± 0.251	7.9 ± 0.100
AFM (3.2 mg/ml)	8.75 ± 1.322*	25.9 ± 0.115
AFM (1,6 mg/ml)	10.35 ± 0.351*	36.73 ± 0.472
AFM (0.8 mg/ml)	23.75 ± 1.258*	49.79 ± 3.664

*Significative difference p>0.05

The measurements of roots length after 72 and 144 h of treatment were analyzed by Kruskal-Wallis test, showing length significantly difference (p<0.05).

The ANOVA analyses of variance between the negative control and the AFM treatments (144 h) shows that there are no significant difference in the roots length (p>0,05).

At the concentrations assayed, significant and dose-dependent reductions in length were observed after treatment (144 h). The EC_{50} for treatment of 72 h and 144 h were 0.078 mg/ml and 4.11 mg/ml respectively. The EC_{50} for $K_2Cr_2O_7$ was 30 mg/l [10].

Microscopic parameters

Mitotic Index: The mitotic index of the cells of *Allium cepa* L. treated with 3.2, 1.6 and 0.8 mg/ml of AFM were 97.8, 99 and 100% respectively. The mitotic index for the negative control was 100%.

Chromosomal aberrations: Normal mitotic phases in meristematic cells were observed (Fig. 4a, b, c and d). The chromosomal aberrations in cells exposed to 3.2 mg/ml of AFM were observed in telophase as losses (Fig. 4e) and sticky (Fig. 4f) chromosomes. Also c- mitosis cells were examined (Fig. 4g). In cells treated with lower concentrations of AFM no aberrations were observed.

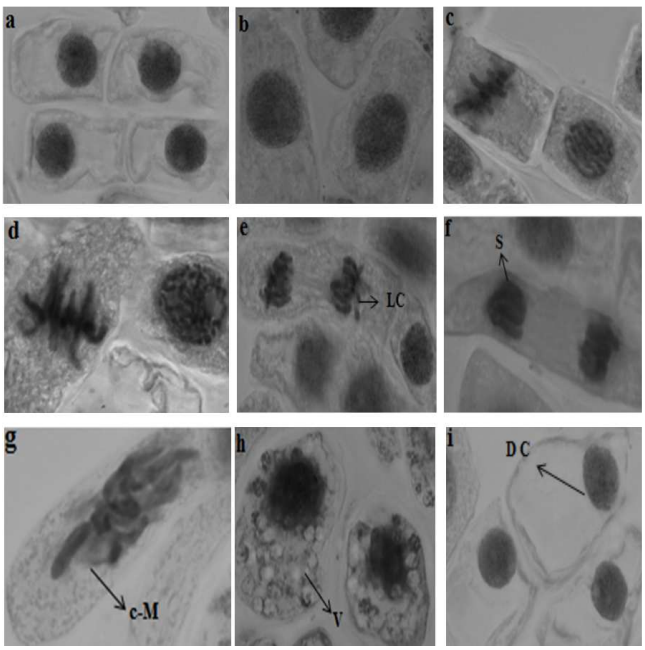


Fig. 4 Chromosomal aberrations of meristematic cells of *Allium cepa* L. induced by AFM from *Bacillus* sp. IBA 33 (100X magnification) a) Normal interphase, b) Normal prophase, c and d) normal metaphase, e) anaphase with losses chromosomes (LC), f) anaphase with sticky chromosome (S), g) c-Mitosis (c-M), h) cytoplasm vacuolization (V), i) decentralization nulcei (DC).

Nuclear and Cytoplasm Abnormalities: The cytoplasms of meristimatic cells treated with 3.2 mg/ml of AFM had morphological alterations. These alterations included vacuolization of the cytoplasm (Fig. 4h) and decentralization nuclei (Fig. 4i). With the all concentrations of AFM assayed, no micronuclei were observed.

Discussion

In previous works realized in our laboratory, the AFM obtained from *Bacillus* sp. IBA 33 were partially identified as lipopeptides like iturins family [1]. The AFM concentrations assayed were chosen according to the effective concentration to control *G. citri-aurantii* in lemon fruits (1.6 mg/ml) [6].

The AFM isolated from *Bacillus* sp. IBA 33 produces disruption of plasmatic membrane of *G. citri-aurantii* (data not shown). The ability of lipopeptides to disrupt a membrane is related to two parameters. The first one is its capacity to penetrate into the membrane at low concentrations; the second one is the molar ratio between lipopeptides and membrane lipids [11]. The capacity of iturin A to cause hemolysis of human erythrocytes has been reported before [12]. Aranda *et al.*

[13] suggest that iturin A induced hemolysis of red blood cells and also induced the leakages of K^+ ions in a concentration dependent way. The hemolysis occurred gradually, inferring that the lipopeptides produced membrane lesion [14].

The behavior of AFM with human erythrocytes was similar to obtained with lipopeptides in a dose–dependent manner. The HC_{50} of AFM from *Bacillus* sp. IBA 33 (10.41 mg/ml) was higher than the lipopeptides obtained from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0.06 mg/ml) [15]. According to these results, AFM have less toxicity than that other lipopeptides.

A. salina is a target organism for the study of organophosphate pesticides [16] and was chosen as testing organism, considering the feasibility of culturing large populations, facility to manage, short term results given in short life cycle and low cost [17].

Siqueira *et al.* [18] defined a substance as highly toxic when the LD_{50} is less than 0.08 mg/ml, moderately toxic, when values are between 0.08 and 0.25 mg/ml and with values over 0.25 mg/ml a substance is considered non-toxic. According to our research, *A. salina* proves to be an excellent organism for toxicity studies of AFM with LD_{50}=2.24 mg/ml. Elkahoui *et al*. [19] studied the toxicity of antifungal extract produced by *B. subtilis* and *B. cereus,* and their results depended of culture medium used for antifungal extract production. The results of the *A. salina* assays showed no evidence of cytotoxicity with surfactin produced by *Bacillus* strain, the LD_{50} was 0.6122 mg/ml [20]. The difference observed between LD_{50} of the lipopeptides of AFM and surfactin should be to the grade of purity of them, by the way, both are non-toxic compounds.

The *Allium cepa* L. is frequently used as a bioindicator of environmental pollution [21]. It is used to determine the toxicity of crude extracts of cyanobacteria [22], and to evaluate the genotoxic potential of medicinal plants [23]. Is an excellent *in vivo* model, where the roots are growing in direct contact with the AFM causing possible chromosomal alterations. The damage of the DNA eukaryotic cells could be predicted.

The results for macroscopic parameters used in the test revealed a dose-dependent inhibition of root growth. 3.2 mg/ml of AFM produce the major inhibition of the root length. Also was observed that the time of treatment was important due to after 144 h the root length was recuperated. It was demonstrated that the toxicity effect was reversible, because the EC_{50} at 72 h was lower than the EC_{50} at 144 h.

The cytotoxicity levels of an agent can be determinate by the mitotic index [24]. According to Hoshina [25] mitotic index significantly lower than the negative control can indicate alterations deriving from the chemical action in the growth and development of exposed organisms. The three concentrations of AFM tested have mitotic index similar to the negative control demonstrating that the AFM have not cytotoxic effect.

The analysis of the mitotic phases in meristematic cells allows determined chromosome aberrations. There were a few cells with chromosome aberrations when they were treated with highest AFM concentration. Micronuclei have been considered by many authors as the most effective and simplest endpoint to analyze the mutagenic effect promoted by chemicals [24]. The absence of micronuclei in meristematic mitotic cells revealed that the AFM were non-mutagenic.

Under our experimental conditions, the three different AFM concentrations assayed may not be considered toxic. However, the results of these studies are promising and can be fundamental for more complex toxicity studies.

References

1. Maldonado MC, Corona J, Gordillo MA, Navarro AR (2009) Isolation and partial characterization of antifungal Metabolites produced by *Bacillus* sp. IBA 33. Curr Microbiol 59: 646-650
2. Emmert EAB, Handelsman J (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiol Lett 171: 1-9
3. Ongena M, Jacques P (2007) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol 16: 115-125
4. Georgiu G, Lin SC, Sharma MM (1992) Surface-active compounds from microorganisms. Biotechnol 10: 60-65
5. Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut 133: 183-198
6. Gordillo MA, Navarro AR, Benitez LM, Torres de Plaza MI, Maldonado MC (2009) Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp. strain IBA 33. Microbiol Insigths 2: 15-24
7. Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F (2012) Investigating the antimicrobial peptide window of activity using cationic lipopeptides with hydrocarbon and fluorinated tails. Int J Antimicrob Ag 40: 36-42
8. Fiskejo G (1997) *Allium* test for screening chemicals; evaluation of citological parameters. In: Plants for Environmental Studies ed. Wancheng, W., Gorsuch, J.W. and Hughes, J.S. pp. 308-329. Florida: CRC press
9. Aportela GP, González PY (2001) Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. An Toxicol 1: 104-108
10. Aurazo de Zumaeta M, Esparza ML (1995) Toxicidad aguda del cromo usando *Allium cepa* L. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. (CEPIS). División de Salud y Ambiente. Organización Panamericana de la salud. (OPS) No 95-25. Lima. Peru
11. Heerklotz H, Seelig J (2001) Detergen –like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. Biophys J 81: 1457-1554
12. Grau A, Ortiz AD, Godos A, Gomez-Fernandez JC (2000) A biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers. Arch Biochem Biophys 377: 315-323.
13. Aranda F, Teruel J, Ortiz A (2005) Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. Biochim Biophys Acta 1713: 51–56.
14. Katsu T, Ninomiya C, Kuroko M, Kobayashi H, Hirota T, Yuzaburo F (1988) Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin S and melittin on erytrocytes membrane. Biochim Biophys Acta 939: 57-63
15. Dehghan-Noudeh G, Housaindokht M, Fazly Bazzaz BS (2005) Isolation, characterization and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. J Microbiol 43,3: 272-276
16. Bustos-Obregon E, Vargas A (2010) Chronic toxicity bioassay with population of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. Biol Res.43: 357-362
17. Giesy JP, Graney RL (1989) Recent developments in and intercomparatisions of acute and chronic bioassyas and bioindicators. Hydrobiologica 188: 21-60
18. Siqueira MJ, Bomm DM, Pereira GFN, Garcez SW, Boaventura MAD (1998) Estudo fitoquimico de *Unonopsis lindmanii-Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. Química Nova, 21: 557
19. Elkahoui S, Djébali N, Tabbene O, Hadjbrahim A, Mnasri B,

Mhamdi R, Shaaba R, Limam F (2012) Evaluation of antifungal activity from *Bacillus* strains against *Rhizoctonia solani*. Afr J Biotechnol 11,18: 4196-4201

20. Felix AKN (2012) Caracterizaçao e estudo da aplicabilidade do biossurfactante producido por *Bacillus subtillis* LAMI005 a partir do suco de caju. Dissetaçao de mestrado apresentada ao programa de Pos-Gradaçao em engenharia química. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil.

21. Morais Leme D, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its applications. Mutation Res 682: 71-81

22. Laughinghouse IV HD (2007) Efeitos citotoxicos e genotoxicos de extratos aquosos de cepas de *Microcystis aeruginosa* (Chrococcales, Cyanobacteria), Thesis, Universidade de Santa Cruz Do Sul (UNISC). Santa Cruz Do Sul, R.S

23. Akinboro A, Bakare AA (2007) Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. J Ethnopharmacol 112: 470-475

24. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesti Biochem Physiol 88: 252-259

25. Hoshina MM (2002) Avaliacao da possivel contaminacao das aguas do Riberao Claro- municipio de Rio Claro, pertenecente a bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*. Trabalho de conclusao (Bacharel e Licenciatura-Ciencias Biologicas) Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, p 52

Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó, Colombia

Jaramillo-Colorado BE[1*], Duarte-Restrepo E[1], Pino-Benítez Nayive[2]

[1]*Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia.*

[2]*Grupo de Productos Naturales, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Chocó, Colombia.*

Resumen: El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química volátil del aceite esencial de varias especies de Piperáceas (*Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis)* y la actividad repelente de ellos contra el gorgojo de granos almacenados *Tribolium castaneum* Herbst. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación, la separación e identificación de los componentes volátiles se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y para la evaluación de la actividad repelente se empleó el método de área de preferencia. Los compuestos mayoritarios encontrados en *Piper dilatatum* fueron el apiol 89,0% y *trans*-cariofileno (3,5%); en *Piper divaricatum,* eugenol (37,5%) y metil eugenol (36,3%); *Piper sp,* α-gurjuneno (o guaieno) (24,9%) y elemol (14,2%); *Piper sanctifelicis,* δ-3-careno (35,3%) y limoneno (27,1%); *Piper aduncum*, dilapiol (48,2%) y 1,8 cineol (11,4%). Los porcentajes de repelencia de los aceites esenciales a una concentración de 1 µL/cm^2, a un tiempo de exposición de 2 horas frente al *T. castaneum* fueron: *Piper aduncum (99%), Piper sp (96%), Piper dilatatum (82%), Piper divaricatum (76%), Piper santifelicis* (33%).

Palabras clave: *Piperaceae,* aceite esencial, actividad repelente, biocida, *Tribolium castaneum.*

Abstract: Evaluation of repellent activity of essential oils obtained from *Piperacea* plants from Choco department, Colombia. The aim of this work was to study the volatile chemical composition of essential oil from various species of *Piperaceae* (*Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, sp Piper, Piper sanctifelicis)* and their repellent activity against stored grain beetle *Tribolium castaneum* Herbst. Essential oils are obtained by hydrodistillation, the separation and identification of volatile components was conducted by gas chromatography and mass spectrometry for the determination of the repellent activity, the preferred area method was used. The main compounds found in *Piper dilatatum* were apiole 89,0% and *trans*-caryophyllene (3,5%); in *Piper divaricatum,* eugenol (37,5%) and methyl eugenol (36,3%); *Piper sp,* α-gurjunene (or guaiene) (24,9%) and elemol (14,2%); *Piper sanctifelicis,* δ-3-carene (35,3%) and limonene (27,1%); *Piper aduncum*, dillapiole (48,2%) and 1,8 cineole (11,4%). Percentages repellency of essential oils at a concentration of 1 µL/cm^2, at an exposure time of 2 hours against *T. castaneum* were: *Piper aduncum* (99%), *Piper* sp (96%), *Piper dilatatum* (82 %), *Piper divaricatum* (76%), *Piper santifelicis* (33%).

Keywords: *Piperaceae,* essential oil, repellent activity, biocide, *Tribolium castaneum*

Introducción

En Colombia, uno de los departamentos con mayor biodiversidad a nivel de flora, es el departamento del Chocó, ubicado entre el océano Pacífico y la cordillera Occidental. Se estima que posee más de 8000 especies de plantas superiores [1]. En esta región se encuentra un nivel alto de especies endémicas y potencialmente útiles, con importancia cultural y socio-económica, ya que están directamente relacionadas con el suplemento de las diferentes necesidades de su comunidad, tales como alimento, medicina, vivienda, etc. [2,3]. En la flora Pacifica colombiana, la familia *Piperaceae* es el cuarto grupo mejor representado en plantas con flores, el departamento del Chocó cuenta con 93 de las 183 especies registradas en el pacifico Colombiano [4,5].

Desde el punto de vista económico el género más importante de esta familia es el *Piper*. Las plantas de este género son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional [6] por las variadas propiedades biológicas que presentan [7], entre ellas, diuréticas [8], antiparasitarias [9,10], antimicrobianas [7,11], antioxidantes [11,12], antiinflamatorias [13], antiviral [14], contra mordidas de serpiente [15], insecticida [7, 16], etc. Sus aceites esenciales en particular inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos [17-19] que causan infecciones importantes en el hombre, las plantas y los animales, presentando además, diversos tipos de actividades como citotóxica, antifúngica, antioxidante, insecticida, larvicida, antinociceptivo, antiinflamatoria, entre otras [17-22]. Numerosas investigaciones han mostrado que existe diversidad química en la composición de los aceites esenciales según las condiciones geobotánicas de cultivo, ambiente, etc, los cual influye directamente en la respuesta a las actividades que se desean evaluar [23, 24]. La fumigación juega un importante papel en la eliminación de plagas de insectos en productos almacenados. Actualmente, la fosfina y el bromuro de metilo (disponible en botellas y latas de metal) son los dos fumigantes comunes utilizados para proteger los granos almacenados de las plagas.

La resistencia de los insectos a la fosfina es un problema mundial, mientras que el bromuro de metilo, un fumigante de amplio espectro, ha sido declarado una sustancia que agota el ozono y por lo tanto, se está eliminando por completo [25,26]. En vista de los problemas con los fumigantes actuales (es decir, compuestos que actúan sobre insectos diana en fase gaseosa), hay un interés mundial en estrategias alternativas, incluyendo el desarrollo de sustitutos químicos y productos vegetales. Sobre éstos últimos, existe una creciente inclinación por los aceites esenciales y sus componentes por su acción fumigante, ya que éstos pueden tener ventaja sobre los convencionales en términos rápida degradación, disponibilidad local [27] y baja toxicidad para los mamíferos (no es cierto en todos los casos), *ie*, Llana *et al* reportaron la ausencia de citotoxicidad de compuestos azufrados obtenidos del aceite esencial de *Allium* spp, en células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 [28].

Numerosas investigaciones han sido realizadas sobre los aceites esenciales y sus componentes como fumigantes, contra insectos de productos almacenados. Las pruebas de toxicidad realizadas con aceites esenciales (principalmente extraídos de plantas pertenecientes a las familias Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae y Myrtaceae) y sus componentes (cianohidrinas, monoterpenoides, compuestos azufrados, tiocianatos, entre otros) se han centrado en gran medida en las plagas de escarabajos como el *Tribolium castaneum* [29-31].

El objetivo de esta investigación fue evaluar la composición química volátil del aceite esencial de 5 plantas Piperáceas recolectadas en el departamento del Chocó: *Piper aduncum, Piper sp, Piper dilatatum, Piper divaricatum* y *Piper santifelicis* y evaluar su actividad repelente contra el gorgojo de la harina *Tribolium Castaneum* Herbst.

*e-mail: beatrizjaramilloc@yahoo.com

Material y métodos

Material vegetal

Las hojas frescas de Piperáceas, fueron recolectadas en el departamento de Chocó, Colombia. La identificación taxonómica se llevó a cabo en el Herbario Nacional de Colombia (COL), los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en dicho Herbario. En la Tabla 1 se muestran la identificación y número de *voucher* de las especies estudiadas.

Tabla 1. *Identificación taxonómica de las Piperáceas estudiadas.*

Especie	No voucher
Piper dilatatum L. Rich	COL 519976
Piper divaricatum G. Mey	Col 519991
Piper aduncum L.	COL 522554
Piper sp	COL 519969
Piper sanctifelicis	COL 519979

Hidrodestilación (HD)

Esta fue realizada en un equipo de destilación tipo Clevenger, según los procedimientos descritos por Jaramillo et al., [32,33]. Se usaron 500 g de hojas y tallos frescos, finamente picados, sumergidos en agua, la duración de la hidrodestilación fue de 2 horas. El aceite esencial se separó del agua por decantación y se le adicionó Na_2SO_4 anhidro. Una alícuota del aceite (30 µL) se diluyó en 1 mL de diclorometano para el análisis cromatográfico.

Análisis Cromatográfico

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un GC Hewlett-Packard (HP) 5890A Series II, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 ºC, relación de *split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250 ºC). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5973, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* de 1:30), un inyector automático *Agilent* 7863, un sistema de datos (HP *ChemStation* 1.05), incluyendo las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K y NIST 98. Se usó una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS de 50 m x 0.25 mm D.I., con fase estacionaria de 5 %-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 µm de grosor. El gas de arrastre fue helio (99.995 %, *Aga Fano, S.A.)*, con una velocidad lineal de 35 $cm.s^{-1}$. La temperatura del horno fue programada de 40 ºC (15 min) hasta 250 ºC (15 min) @ 5 °C min^{-1} [25]. Para la identificación de los compuestos se usaron algunos terpenos estándar, analizados bajo las mismas condiciones instrumentales que las muestras, espectros de masas e índices de retención de *Kováts* de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura [34,35].

Insectos

Para los experimentos se utilizaron adultos de *Tribolium Castaneum* Herbts. (*Coleóptera:* Curculionidae), los cuales se mantuvieron sobre un sustrato de granos de harina de maíz. Los cultivos de insectos se mantuvieron en la oscuridad a 25 ± 1 °C y 70 ± 5 % de humedad relativa.

Actividad repelente

Este ensayo se realizó usando la técnica de área de preferencia [32,36]. Para realizar el ensayo se colocaron un total de 20 insectos adultos de *T. castaneum* Herbts en el interior de una caja de *Petri* con papel filtro cortado a la mitad, resultando dos áreas de trabajo, una tratada con volúmenes iguales de diferentes concentraciones de aceite esencial disuelto en acetona (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 y 1,0 $\mu L/cm^2$), y la otra con acetona únicamente. Para identificar el área tratada con el aceite del área no tratada, fue colocado un punto en el centro de una de las mitades del papel filtro, luego de esto, se contaron los organismos presentes en cada mitad del papel filtro después de dos y cuatro horas de exposición.

El porcentaje de repelencia (PR) en los diferentes tiempos de exposición fue hallado utilizando la formula PR= [(ANT-AT)/(AT+ANT)*100], donde ANT Y AT corresponden al número de insectos de las áreas no tratadas con el aceite y tratadas con el mismo, respectivamente. Cada concentración fue evaluada 5 veces y el ensayo se realizó por duplicado. Durante el ensayo se tuvo en cuenta que el diámetro del papel filtro coincidiera con el tamaño de las cajas de *Petri* y hacer las mediciones en oscuridad absoluta con el fin de obtener resultados veraces.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media ± error estándar. La significación estadística fue determinada por los test de *Duncan* y *Tukey*. El análisis de varianza determinó si los resultados obtenidos para los ensayos de actividad repelente son estadísticamente diferentes. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

Resultados

Composición química volátil

La Tabla 2 muestra los principales componentes hallados en los aceites esenciales de las Piperáceas trabajadas. Fueron identificados metabolitos secundarios en concentraciones superiores al 0,1 %. Los compuestos mayoritarios encontrados en *Piper dilatatum* fueron el apiol 89,0% y *trans*-cariofileno (3,5%), cubebeno (0,8%); en *Piper divaricatum,* Eugenol (37,5%), Metil eugenol (36,3%) y β-elemeno (10,7%); *Piper sp,* α-gurjuneno (o guaieno) (24,9%), elemol (14,2), δ-3-careno (11,4%);, *Piper sanctifelicis* δ-3-careno (35,3%), limoneno (27,1%), β-pineno (6,9%); *Piper aduncum*, dilapiol (48,2%), 1,8 cineol (11,4%), cariofileno (8,3%), espatulenol (4,2%).

Actividad repelente

Los resultados de la actividad repelente del aceite esencial de *Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis* son presentados en la Tabla 3. Los valores positivos representan actividad repelente y los negativos atrayente.

Los aceites esenciales de *Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divericatum* y *Piper sp* presentaron actividad repelente, respectivamente de 65,6%, 89%, 73% y 96%; a una concentración del aceite esencial de $1 \mu L/cm^2$.

Discusión

A través del tiempo, especies de la familia *Piperaceae*, han sido consideradas de importancia económica por su uso condimentario [7]. Además, porque han demostrado significativas propiedades medicinales, etnofarmacológicas [6] y como fuente de insecticidas naturales [37], lo cual justifica la bioprospección de estas especies.

En este trabajo de evaluó la composición química volátil de los aceites esenciales de *Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis*, procedentes del departamento del Chocó, Colombia. Estos aceites mostraron variación cualitativa y cuantitativa comparada con la encontrada en especies de otras regiones. Por ejemplo mientras que los compuestos mayoritarios encontrados en el *P dilatatum* del Chocó fueron apiol (89%) y cariofileno (8,3%), en las del estado de Ceará, Brasil fueron felandreno (22,5%), Δ-3-careno (10,2%), biciclogermacreno (25,0%), cariofileno (10,2%) y E-nerolidol (6,2%) [38]. En otro estudio, reportado por Andrade *et al*., se recolectaron especímenes de 12 regiones diferentes de Brasil y se obtuvieron 7 grupos de acuerdo con los compuestos mayoritarios tenidos de la siguiente manera: grupo A (E-cariofileno, α-cadinol, germacreno D), Grupo B (espatulenol, biciclogermacreno y (*Z*)-β-ocimeno), grupo C (espatulenol, germacreno D y (*E*)-nerolidol, Grupo D (germacreno D, limoneno, α-felandreno and biciclogermacrene; Grupo E (β-elemeno, germacreno D y β-pineno; Grupo F (curzereno, *p*-cymeno y α-eudesmol) y Grupo G ((*Z*)-α-bisaboleno,

Tabla 2. *Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis, obtenidos por HD.*

No	Compuesto	Ik[a] HP-5	Porcentaje de área[b], %				
			P. dilatatum	*P. aduncum*	*P. divaricatum*	*Piper sp*	*P. sanctifelicis*
1	α-Pineno	938	0,4	0,5	-	1,1	4,4
2	β-Pineno	982	0,6	-	-	1,9	6,9
3	δ-3-Careno	1014	-	-	-	11,4	35,3
4	*p*-Cimeno	1024	-	0,8	-	-	4,9
5	Limoneno	1028	-	-	-	2,4	27,1
6	1,8-Cineol	1035	-	11,4	-	-	-
7	Linalool	1096	-	-	-	-	2,3
8	Eugenol	1356	-	-	37,5	-	-
9	β - Cubebeno	1390	0,8	-	0,8	-	-
10	Metileugenol	1401	-	-	36,3	-	-
11	*trans*-Cariofileno	1418	8,3	6,0	3,0		-
12	γ -Elemen	1433	1,6	-	10,7	7,3	-
13	γ -Gurjuneno	1473	-	-	-	24,9	-
14	β -Selineno	1485	0,4	-	0,5	2,8	-
15	γ -Cadineno	1513	1,7	-	-	1,9	-
16	Acetato de eugenilo	1524	-	-	3,2	-	-
17	Isómero Nerolidol	1540	-	-	-	-	5,8
18	Dilapiol	1622	-	48,2	0,8	-	-
19	Apiol	1680	89,0	0,6	1,8	-	-
20	Elemol	1549	-	-	-	14,1	-
21	Elemicina	1556	-	-	3,4	-	-
22	Espatulenol	1576	4,2	-	-	1,8	-
23	Asarona	1624	-	-	-	-	-
24	β -Eudesmol	1632	-	-	2,0	5,7	-

[a]Indices de *Kováts* determinados experimentalmente en Columna HP-5.
[b]Promedio de tres extracciones ± ts/√*n* (*n* = 4, 95% confidencia).
HD: hidrodestilación.

curzereno y germacreno D) [23].

De otra parte, los compuestos mayoritarios encontrados en los aceites esenciales de *P. divaricatum*, *P.aduncum y P. sanctifelicis* difieren de los reportados por otros investigadores. De acuerdo con Barbosa et al., el compuesto principal encontrado en *P. divaricatum* fue el safrol en hojas, tallos y frutos (83-98%) [39]. Mientras que Almeida *et al*., reportó linalool (23,4–29,7%), β-pineno (19,9–25,3%) y α-pineno (9,0–18,8%) [40]. Da silva presentó en su investigación como compuestos mayoritarios el metileugenol (63,8%) y el eugenol (23,6%) [41], similares a los encontrados en éste trabajo. El compuesto mayoritario encontrado en *P. aduncum* en Chocó, Colombia fue el dilapiol, este también fue reportado como mayoritario en el AE de plantas recolectadas en áreas deforestadas del amazonas al norte de Brasil [42, 43], en Manaos [44] y Ecuador [17]. Pero en los aceites esenciales de *P. aduncum* obtenidos de plantas de poblaciones *Brazlândia y Parque do Guará* (Brasil) los componentes mayoritarios fueron 4-terpineol y piperitona [45].

La toxicidad de los aceites esenciales sobre los insectos de productos almacenados es influenciada por la composición química del aceite, lo que a su vez depende de la fuente, la temporada y condiciones geobotánicas, influencia del medio ambiente, el método y tiempo de extracción, parte de la planta utilizada. La variabilidad química puede tener importancia ecológica y taxonómica en la gestión y la utilización económica de la especie [24,45].

La composición química de los aceites esenciales, también determina la actividad biológica que estos ejercen. Por ejemplo, extractos y aceites esenciales de diferentes especies del género *Piper* incluyendo sus metabolitos secundarios han sido usados como preservativos, bactericidas, antifúngicos insecticidas, larvicidas, entre otros [7-22]. *P. dilatatum, P divaricatum, P. aduncum* y *P. sanctifelicis* han mostrado actividad antibacterial y antifungica [40-46]. Los aceites esenciales de *P. aduncum* y *P. divaricatum* hna mostrado actividad antimicrobial [10], larvicida, insecticida y repelente [43, 47].

Poco se conoce acerca del mecanismo de acción de los repelentes, se cree que interfieren con los receptores olfatorios de atracción hacia la fuente de alimento del insecto. Las propiedades repelentes de los aceites esenciales parecen estar asociadas a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos en su composición química volátil.

Tabla 3. *Actividad repelente de los aceites esenciales de Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis contra el Tribolium castaneum Herbst.*

Aceite esencial	Porcentaje de repelencia según el tiempo de exposición, %									
	2 horas de exposición					4 horas de exposición				
	0,0001 µL/cm²	0,001 µL/cm²	0,01 µL/cm²	0,1 µL/cm²	1,0 µL/cm²	0,0001 µL/cm²	0,001 µL/cm²	0,01 µL/cm²	0,1 µL/cm²	1,0 µL/cm²
P. sanctifelicis	38±9	35±8	25±10	17±9	33±5	33±8	36±8	22±10	20±9	40±5
P. dilatatum	36±7	45±6	51±4	65±6	82±5	16±9	43±9	58±5	65±9	82±4
P. aduncum	2±6	39±8	74±6[a]	89±5[b]	99±1[b]	14±8	38±8	71±6[b]	86±6[b]	100±0[b]
P. divaricatum	28±14	29±8	35±7	73±6	76±4	21±17	36±7	39±11	75±6	75±3[a]
Piper sp.	21±7	33±7	43±10	63±10[a]	96±2[b]	-2±14	5±15	31±15	70±8[a]	86±5[b]
Control	5±9	31±9	44±4	65±12	85±5	21±7	24±8	38±13	45±6	48±11

[a]*Existe diferencia significativa entre el aceite esencial y el repelente comercial (P>0,05)*
[b]*Existe diferencia significativa entre el aceite esencial y el repelente comercial (P>0,01)*

Algunos monoterpenos tales como α-pineno, cineol, eugenol, limoneno, terpinoleno, citronelol, citronelal, alcanfor, timol, dilapiol, entre otros; y sesquiterpenos como el nerolidol, α-humuleno and β-cariofileno son componentes comunes de un número de aceites esenciales descritos en la literatura, con actividad repelente [36, 47-49].

Los aceites esenciales o sus componentes que muestran actividad fumigante, generalmente tienen baja toxicidad para los mamíferos. Por ejemplo, los valores de la DL_{50} oral (mg/kg de peso corporal) para ratas de algunos aceites esenciales son: cálamo (0,78), alcaravea (3,50), eucalipto (4,44), tomillo (2,84), menta (4,41) y el de los principales constituyentes son: anetol (2,09), carvacrol (0.81), 1,8-cineol (2.48), p-cimeno (4,75), limoneno (4,60), linalol (2.79) y terpineol (4.3) [26, 50]. Al mismo tiempo, debe tenerse en cuenta que no todos los compuestos que se encuentran en aceites esenciales de plantas son inocuos. Por ejemplo, los compuestos estragol y (+)-fenchona presentes en el aceite esencial de *Foeniculum vulgare* (son altamente eficaces contra *Sitophilus oryzae, Callosobruchus chinensis* y *Lasioderma serricorne*) son conocidos por ser cancerígenos [51].

Conclusión

Los aceites esenciales de especies del género *Piper* pueden ser una alternativa atractiva de origen natural para el control de insectos como el *Tribolium castaneum* en productos alimenticios almacenados (postcosecha).

Agradecimientos

A la Universidad de Cartagena y su Grupo de Investigaciones Agroquímicas. Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Tecnológica del Chocó. A Rosa Cuadro y María González.

Bibliografía

1. Pino-Benitez N (2008) Plantas Útiles en el departamento del Chocó Parte I: Extractos. Uryco Ltda. Medellín, Colombia. pp.312.
2. Mosquera LJ, Robledo D, Asprilla A (2007) Diversidad florística de dos zonas de bosque tropical húmedo en el municipio de alto Baudó, Chocó colombia. *Acta Biol Colomb* 12: 75-90.
3. Nayive-Pino B, Yurgaky-Espinosa T, Cuesta-Nagles J (2005) Aspectos Botánicos y Química Preliminar de Seis Especies del Género *Piper* Usadas como Medicinales en el Municipio de Quibdó-Chocó. Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo 23: 20-25.
4. Rangel JO (2004) Diversidad y riqueza de espermatofitos en el Chocó biogeográfico. En: Rangel JO Colombia diversidad biótica IV. El Choco biogeográfico/Costa Pacífica. Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá, 83-99.
5. Pino-Benítez N (2008) Actividad Antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del genero *Piper* L. (*Piperaceae*). Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo 27:65-75.
6. Roersch CMFB (2010) *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. Review. J Ethnopharmacol 131: 522-537.
7. Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Farooq S, Ali M, Khan MA (2012) Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. Asian Pac J Trop Biomed 2: S1945-S1953.
8. Da Silva-Novaes A, Da Silva-Mota J, Barison A, Veber CL, Negrao FJ, Leite Kasuya CA, De Barros ME (2014) Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). Phytomedicine 21: 523-528.
9. Dal Picolo CR, Bezerra MP, Gomes KS, Passero LF, Laurenti MD, Martins EG,
10. Sartorelli P, Lago JHG (2014) Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. Fitoterapia 97: 28-33.
11. Adate PS, Parmesawaran S, Chauhan Y (2012) in vitro Anthelmintic Activity of Stem Extracts of *Piper betle* Linn Against *Pheritima Posthuma*. Phcog J 4: 61-65.
12. Zarai Z, Boujelbene E, Ben Salem N, Gargouri Y, Sayari A (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. LWT-Food Sci Technol 50: 634-641.
13. Hernández LA, Guerrero-Beltrán JA (2014) Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. Food Chem 142: 455-460.
14. Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LFS, Martín-Calero MJ, Vidari G (2010) Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from Piper carpunya Ruiz & Pav. J Ethnopharmacol 128: 583-589.
15. Jiang ZY, Liu WF, Zhang XM, Luo J, Ma YB, Chen JJ (2013) Anti-HBV active constituents from *Piper longum*. Bioorg Med Chem Lett 23: 2123-2127.
16. Shenoy PA, Nipate SS, Sonpetkar JM, Salvi NC, Waghmare AB, Chaudhari PD (2013) Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (*Piperaceae*) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. J Ethnopharmacol 147: 373-382.
17. Kanis LA, Rabelo BD, Moterle D, Machado Nogaretti R, Nunes T, Santos da Silva O, Somariva Prophiro J (2013) Standardized extract of *Piper ovatum* (*Piperaceae*) to control *Aedes aegypti* larvae *(Diptera*: *Culicidae*). Ind Crop Prod 50: 816-820.
18. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, Andreotti ME, Tognolini M, Maldonado ME, Bruni R (2009) Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (*Piperaceae*) essential oils from Eastern Ecuador. Environ Toxicol Phar 27: 39-48.
19. Da Silva JKR, Pinto LC, Burbano RMR, Montenegro RC, Guimarães EF, Andrade EHA, Maia JGS (2014) Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. Ind Crop Prod 58: 55-60.
20. Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Kumar-Mishra P, Kishore Dubey N(2010) Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. Int J Food Microbiol 142: 114-119
21. Qin W, Huang S, Li Ch, Chen S, Peng Z (2010) (Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum Roxb. (Piperaceae*) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (*Coleoptera*: Hispidae). Pestic Biochem Phys 96 132–139.
22. Matasyoh JC, Wathuta EM, Kariuki ST, Chepkorir R (2011) Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. J Asia Pac Entomol 14: 26-28.
23. Lima DKS, Ballico LJ, Roch- Lapa F, et al (2012) Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. J Ethnopharmacol 142: 274-282.
24. Andrade EH, Alves CN, Guimarães EF, Carreira LMM, Maia JGS (2011) Variability in essential oil composition of *Piper*

dilatatum L.C. Rich. Biochem Syst Ecol 39: 669–675.

25. Oliveira GL, Moreira D, Mendes ADR, et al (2013) Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. Rev Bras Farmacogn 23:743-753.
26. Taylor RWD (1989) Phosphine a major fumigant at risk. Int Pest Control 31: 10–14.
27. Rajendran S, Sriranjini V (2008) Plant products as fumigants for stored-product insect control. J Stored Prod Res 44: 126–135.
28. Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Ann Rev Entomol 51: 45–66.
29. Llana Ruiz-Cabello M, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Cameán AM (2013) Estudio in vitro de la viabilidad de células Caco-2 en presencia de componentes del aceite esencial de *Allium* spp. Rev Toxicol 30: 144-148.
30. Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. Pest Manag Sci 58: 1101–1106.
31. Koul O (2004) Biological activity of volatile di-n-propyl disulfide from seeds of neem, *Azadirachta indica* (Meliaceae), to two species of stored grain pests, *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). J Econ Entomol 97: 1142–1147.
32. Erler F (2005) Fumigant activity of six monoterpenoids from aromatic plants in Turkey against the two stored-product pests confused flour beetle, *Tribolium confusum*, and Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. J Plant Dis Protect 112: 602–611.
33. Jaramillo-Colorado BE, Martelo IP, Duarte E (2012) Antioxidant and repellent activities of the essential oil from Colombian *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson. J. Agric Food Chem 60: 6364-6368.
34. Jaramillo Colorado BE, Martelo IP, Delgado W (2012) Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. Rev Cubana de Plant Med 17:54-64.
35. Adams RP (1995) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream (Illinois), USA. pp. 469.
36. Davies NW (1990) Gas chromatography retention indices of monoterpenos and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. J Chromatogr A 503:1-24.
37. Tapondjou A, Adler C, Fontem D, Bouda H, Reichmuth C (2005) Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens and Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. J. Stored Prod Res 41: 91–102.
38. Celis A, Mendoza C, Pachón M, Cardona J, Delgado W, Cuca LE (2008) Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. Rev Agron Colomb 26: 97-106.
39. Cysne JB, Canuto KM, Pessoa ODL, Nunes EP, Silveira ER (2005) Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. J Brazil Chem Soc 16: 1378-1381.
40. Barbosa QPS, da Câmara CAG, Ramos CS (2012) Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of Piper divaricatum: a new source of safrole. Quim Nova 35: 1806-1808.
41. De Almeida JGL, Silveira ER, Pessoa ODL, Nuñes EP (2009) Essential oil composition from leaves and fruits of *Piper divaricatum* G. Mey. J Essent Oil Res 21: 228-230.
42. Da Silva JK, Andrade EH, Guimarães EF, Maia JG (2010) Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. Nat Prod Commun 5: 477-480.
43. De Almeida RR, Souto RN, Bastos CN, da Silva MH, Maia JG (2009) Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. Chem Biodivers 6: 1427-1434.
44. Souto RN, Harada AY, Andrade EH, Maia JG (2012) Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fire ant Solenopsis saevissima (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). Neotrop Entomol 41: 510-517.
45. Silva AL, Chaves FCM, Lameira RC, Bizzo HR (2013) Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. Rev Bras Plantas Med 15: 670-674.
46. Potzernheim MCL, Bizzo R, Silva JP, Vieira RF (2012) Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. Biochem Syst Ecol 42: 25–31.
47. Tangarife-Castaño V, Correa-Royero JB, Roa-Linares VC, Pino-Benitez N, Betancur-Galvis LA, Durán DC, Stashenko EE, Mesa-Arango AC (2014) Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. J Essent Oil Res 26: 221-227.
48. Araujo MJC, Camara CAG, Born FS, Moraes M (2012) Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. Exp Appl Acarol 57: 139-155.
49. Ukeh DA, Umoetok SBA (2011) Repellent effects of five monoterpenoid odours against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Calabar, Nigeria. Crop Prot 30:1351–1355.
50. Aciole EH, Guimarães NN, Silva AS, Amorim EM, Nunomura SM, Garcia AC, Cunha KS, Rohde C (2014) Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of Drosophila melanogaster. Pest Manag Sci 70:559-565.
51. Lee S, Peterson CJ, Coats JR (2003) Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. J Stored Prod Res 39: 77–85.
52. Kim DH, Ahn YJ (2001) Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. Pest Manag Sci 57: 301–306.

Rev. Toxicol (2015) 32: 117-120

Intoxicaciones veterinarias en Chile reportadas al Centro de Información Toxicológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC)

Cerda P.[1], Silva L.[1], Gutiérrez W.[1], Mieres JJ, París E.[1], Ríos J.C[2].*

1Centro de Información Toxicológica UC, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

2Departamento de Laboratorios Clínicos, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile

Resumen: Las intoxicaciones en animales son una problemática a nivel mundial, constituyen una causa habitual de consultas veterinarias y muertes. En Chile existe escasa información sobre el tema y se hace necesario investigar sobre agentes tóxicos involucrados y especies expuestas. En este estudio se describen las exposiciones a diferentes agentes potencialmente tóxicos por parte de animales registradas por el CITUC durante el período 2006-2013. Las variables analizadas fueron especie, agente, vía de exposición, interlocutor y lugar de procedencia del llamado de acuerdo al formato de la O.M.S. Se analizaron 3.261 llamados, predominando las exposiciones en perros (83,6%), siendo el principal interlocutor el dueño del animal (74,3%). El principal agente correspondió a plaguicidas (63,1%), destacándose entre ellos los rodenticidas (58,4%). Los llamados se realizaron principalmente desde el hogar (74,6%), seguido por clínicas veterinarias (22,8%). La probabilidad de exposición por plaguicidas en perros fue 1,3 veces superior que en otras especies de animales ($IC_{95\%}$: 1,1-1,6). Al analizar las intoxicaciones por rodenticidas se observó que el 91,8% de éstas se produjo en perros y que el riesgo de exposición en esta especie por esta familia de plaguicidas fue 2,3 veces superior ($IC_{95\%}$: 1,4-3,7) con respecto a otros animales. En conclusión, la mayoría de estas exposiciones reportadas ocurrió en animales de compañía. El conocimiento sobre el peligro potencial de los tóxicos presentes en el hogar por parte de los responsables de la tenencia de mascotas, juega un papel fundamental en la prevención de intoxicaciones en especies animales.

Palabras clave: Plaguicida, intoxicación, toxicidad, veterinaria, estudio epidemiológico.

Abstract: Poisonings in animals are a worldwide problem, a common cause of veterinary consultations and death. In Chile there is little information on the subject and there is a need to research on toxic agents and the exposed species involved. In this study, the poisonings in animals registered by CITUC during the period 2006-2013 are described. The variables analyzed were species, agent, route of exposure, interlocutor and place of origin of the calling according to the WHO format. 3.261 calls were analyzed, dogs poisoning predominated (83.6%), the main interlocutor was the pet owner (74.3%). The main agent corresponded to pesticides (63.1%), especially rodenticides (58.4%). The calls were made mainly from home (74.6%), followed by veterinary clinics (22.8%). The probability of pesticide exposure in dogs was 1.3 times higher than in other animal species (95% CI: 1.1-1.6). When analyzing rodenticide poisoning it was observed that 91.8% of them occurred in dogs and that the risk of poisoning in this species by this family of pesticides was 2.3 times higher (95% CI: 1.4-3.7) in comparison to other animals. In conclusion, most of the reported poisonings occurred in home pets. Knowledge about the potential danger of the toxic agents presents at home by the pet ownership, plays a key role in preventing poisoning in animals.

Keywords: Pesticides, poisoning, toxicity, veterinary, epidemiologic study.

Introducción

Las intoxicaciones en animales domésticos son una problemática a nivel mundial. Constituyen una de las causas más habituales de consulta de urgencias veterinarias en pequeños animales y una de las principales causas de muerte en perros, luego de enfermedades infecciosas [1]. Estos antecedentes son una preocupación constante, tanto en dueños de mascotas, como en profesionales veterinarios, pues cada caso de intoxicación provoca un daño asociado que puede ser ecológico, económico y afectivo [2].

El número de mascotas en riesgo de sufrir una intoxicación es elevado. En Estados Unidos el 39% de los hogares posee al menos un perro y alrededor del 33% de los habitantes posee al menos un gato [3]. En Chile, según datos del Programa Nacional de tenencia responsable de animales de compañía periodo 2014-2017, se estima que la población canina en la ciudad de Santiago es de 3.444.475 y la población felina es de 1.127.379[4]. Un estudio sobre los aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago, estima que por cada 6,4 habitante existe un perro y por cada 14,7 habitantes existe un gato [5].

Los agentes tóxicos que afectan a las especies domésticas son extremadamente diversos. Entre estos se encuentran con frecuencia: metales, micotoxinas, contaminantes alimentarios, agentes farmacéuticos, pesticidas, plantas, entre otros agentes [6].

Algunas intoxicaciones se producen por ingestión accidental, otras por absorción cutánea y en ciertas ocasiones porque los propietarios medican a sus mascotas de forma inadecuada [7].

Existen variaciones individuales entre las diversas especies animales que determinan su susceptibilidad a sustancias potencialmente tóxicas y el riesgo de intoxicación [6]. Un ejemplo de ello muy común es la baja tolerancia que muestran tanto caninos como felinos al paracetamol, en contraste con los humanos. En estas especies bajas dosis producen cuadros graves de toxicidad e incluso la muerte del animal [7, 8].

Por todos los antecedentes antes expuestos podemos señalar que, en nuestra sociedad existe una necesidad de información técnica de riesgo toxicológico en animales, ya que la toxicología es una sub-especialidad de la medicina veterinaria y muchos clínicos desconocen en detalle esta disciplina, además de los clínicos también existe una necesidad de parte de los dueños de las mascotas, por su desconocimiento de qué hacer frente a la exposición de tóxicos por parte de sus animales. El Centro de Información Toxicológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC) entrega asesoría técnica telefónica en emergencias toxicológicas y para el manejo de pacientes intoxicados tanto en casos de pacientes humanos como en animales, respondiendo así a las necesidades de conocimiento de los dueños de mascotas como de veterinarios en relación a riesgo de toxicidad en diversas especies de animales asociado a la exposición a tóxicos.

En Chile existe escasa información en relación a intoxicaciones en animales y dado el aumento de éstas, es necesario investigar cerca del tema. El objetivo de este trabajo es conocer el perfil epidemiológico de las exposiciones a tóxicos en animales registradas por el CITUC

*e-mail: jcrios@med.puc.cl

durante el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2006 y el 31 de diciembre de 2013.

Material y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo con componente analítico. Se seleccionaron todas las consultas por exposiciones de animales registradas en la base de datos de CITUC durante el período mencionado. La recolección de datos se realizó en CITUC durante las 24 horas del día y todos los días del año del periodo comprendido en el estudio, abarcando además, registros desde todo el territorio nacional. Cada llamado fue evaluado por un profesional competente del centro en relación al riesgo considerando varios factores como: la especie animal, agente y vía de exposición, dosis del tóxico, tiempo trascurrido desde la exposición e interlocutor del llamado (persona que realizó el llamado). Luego de evaluar el riesgo toxicológico y entregar la información técnica al interlocutor del caso, CITUC generó un registro utilizando el mismo documento e instrumento [9].

Los llamados recibidos se generaron de manera voluntaria por el interlocutor. Cada caso fue atendido por un profesional de la salud capacitado en manejo de emergencias toxicológicas y posteriormente registrado en la base de datos del Centro. La información aportada por el interlocutor se obtuvo a través de la aplicación del instrumento *Communication Record* [8], del *International Programme on Chemical Safety* (IPCS INTOX) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [10].

Las variables analizadas fueron: especie animal, agente causal clasificado según el modelo IPCS [10], vía de exposición (ingesta, inhalatoria, cutánea, otras); interlocutor (persona que llama al CITUC: dueño del animal, veterinario, otro, desconocido); lugar de procedencia del llamado (hogar, clínica veterinaria, otro, desconocido) y región del llamado (de acuerdo a la distribución político administrativa). Estas variables se analizaron a través de distribución de frecuencias y tablas de contingencia utilizando el programa estadístico SPSS 21.0.

A través de tablas de contingencia se exploró la asociación entre las variables especie perro y agente plaguicida; especie perro y agente rodenticida; y agente (organofosforado, carbamato, piretroide) y vía de exposición (cutánea; otra vía). Se aplicó el estadístico χ^2 para comparación de proporciones. Se calcularon *Odds Ratios* (OR) con sus respectivos intervalos de confianza a 95% para estimar la magnitud de la asociación entre variables de interés. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Durante el período descrito, CITUC recibió 3.261 llamados por exposición en animales con un promedio de 407,6 casos anuales en Chile.

Al analizar la especie animal se observó predominio de las exposiciones en perros (83,6%), seguido por gatos (8,9%) (Tabla 1). Las principales vías de exposición fueron ingestión (84,5%), cutánea (9,6%) e inhalatoria (3,3%). El interlocutor principal correspondió al dueño del animal (74,3%) y en segundo lugar a personal veterinario (24,7%). Los llamados al CITUC se realizaron principalmente desde el hogar (74,6%), seguido por clínicas veterinarias (22,8%) (Tabla 2).

Al analizar el agente responsable de la intoxicación se obtuvo que un 63,1% de los casos se produjo por exposición a plaguicidas, seguido por agentes de uso doméstico (16,0%) y medicamentos (9,6%) (Tabla 3). Dentro de la familia de plaguicidas destacan los rodenticidas anticoagulantes, que son los únicos registrados en Chile, (58,4%); piretroides (15,3%) y organofosforados/carbamatos (11,7%) (Tabla 4).

Con respecto a los rodenticidas anticoagulantes el de mayor frecuencia correspondió a brodifacoum (62,2%), seguido por rodenticida desconocido (23,1%) y coumatetralilo (6,98%). Al analizar los piretroides se observó que el mayor número de llamados se originó por permetrina (24,1%), seguido por cipermetrina (20,6%) e imiprotrina/cipermetrina (14,3%). Finalmente, entre los organofosforados/ carbamatos el mayor número de casos se produjo por triclofon/fenitrotion (28,3%), coumafos (20,4%) y organofosforado desconocido (16,3%) (Tabla 4).

Al contrastar especie perro y agente plaguicida, se observó que el porcentaje de exposición en esta especie a plaguicidas fue 64,2% (1.751/2.726), a diferencia de 57,1% en otras especies (306/535). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (χ^2: 9,5; $p < 0,005$). El riesgo de intoxicación por plaguicidas en perros fue 1,3 veces superior que en otras especies (OR: 1,34; $IC_{95\%}$: 1,1-1,63; $p<0,05$) (Tabla 5).

Al contrastar especie perro y agente rodenticida, se observó que el porcentaje de exposición a estos agentes en esta especie animal fue 8,2% (224/2.726), a diferencia de un 3,7% en otras especies (20/535). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (χ^2: 12,9; $p< 0,001$). El riesgo de exposición a rodenticidas en perros fue 2,3 veces superior (OR: 2,3; IC $_{95\%}$: 1,4-3,7; $p<0,001$) que en otras especies animales (Tabla 6).

Tabla 1. *Distribución de casos según especie*

Especie	(n)	%
Perro	2.726	83,6
Gato	291	8,9
Animal desconocido	158	4,8
Otro	36	1,1
Conejo	17	0,5
Caballo/pony	14	0,4
Vaca	9	0,3
Mamífero marino	6	0,2
Ave de Corral	3	0,1
Cobayo	2	0,1
Total	3.261	100,0

Tabla 2. *Distribución de casos según antecedentes del llamado a CITUC*

Interlocutor	(n)	%
Dueño / Familiares	2.423	74,3
Personal veterinario	804	24,7
Otro	25	,8
Desconocido	9	,3
Total	3.261	100,0
Lugar de procedencia del llamado	(n)	%
Hogar / Alrededores	2.434	74,6
Clínica veterinaria	745	22,8
Desconocido	48	1,5
Otro	34	1,0
Total	3.261	100,0

Tabla 3. *Distribución de casos según familia de agente*

Agente	**(n)**	**%**
Plaguicidas	2.057	63,1
Agente de uso doméstico general	521	16,0
Medicamento	312	9,6
Agente de uso industrial	155	4,8
Planta/hongo	73	2,2
Arañas y animales	37	1,1
Cuerpo extraño	32	0,9
Agente desconocido	31	1,0
Alimento/bebida	28	0,9
Sustancia de abuso	14	0,4
Contaminante ambiental	1	0,1
Total	3.261	100,0

El riesgo de exposición a carbamatos, organofosforados y piretroides a través de vía de exposición cutánea fue 1,3 veces superior en relación a otras vías de exposición (OR: 1,3; $IC_{95\%}$: 1,02-1,7; p<0,05). (Tabla 7).

Tabla 4. *Distribución de casos según agente Plaguicida*

PLAGUICIDAS	n	%	Total
Rodenticidas	**1.203**	**100,0**	58,5
Brodifacoum	*748*	62,1	
Rodenticida desconocido	*278*	23,1	
Coumatetrarilo	*84*	6,9	
Bromadiolona	*56*	4,7	
Flocumafeno	*15*	1,3	
Difetialona	*15*	1,3	
Difenacoum	*7*	0,6	
Piretroide	**315**	**100,0**	15,3
Permetrina	*76*	24,1	
Cipermetrina	*65*	20,6	
Imiprotrina / Cipermetrina	*45*	14,3	
Lambdacialotrina	*33*	10,5	
Ciflutrina	*21*	6,7	
Piretroide desconocido	*20*	6,4	
Fenotrina / Praletrina	*18*	5,7	
Cifenotrina / Permetrina	*16*	5,1	
Deltametrina	*8*	2,5	
Aletrina	*4*	1,3	
Flumetrina	*4*	1,3	
Imiprotrina / Deltametrina	*4*	1,3	
Fenotrina	*1*	0,3	
Organofosforados/carbamatos	**240**	**100,0**	11,7
Triclorfon / Fenitrotion	*68*	28,3	
Coumafos	*49*	20,4	
Organofosforado desconocido	*39*	16,3	
Dimetoato	*17*	7,1	
Diazinon	*15*	6,3	
Carbofurano	*9*	3,8	
Diclorvos	*9*	3,8	
Carbarilo	*8*	3,3	
Clorpirifos	*6*	2,5	
Metamidofos	*6*	2,5	
Aldicarb	*5*	2,1	
Metomilo	*3*	1,3	
Oxamilo	*2*	0,8	
Metiocarb	*2*	0,8	
Bendiocarb	*1*	0,4	
Fention	*1*	0,4	
Otros plaguicidas*	**299**	**100,0**	**14,5**
TOTAL	**2.057**		**100,0**

Discusión

Las principales especies expuestas a riesgo de intoxicaciones en este estudio correspondieron a perros y gatos, es decir, los principales animales domésticos de compañía presentes en Chile, situación

Tabla 5. *Riesgo de intoxicación por agente plaguicida en perros*

Especie	Plaguicida (n)	Otro agente (n)	Total (n)	OR	IC 95%	Valor p
Perro	1.751 (53,7%)	975 (29,9%)	2.726 (83,6%)	**1,34**	1,10-1,60	‹ 0,005
Otra especie	306 (9,4%)	229 (7,0%)	535 (16,4%)			
Total	2.057 (63,1%)	1.204 (36,9%)	3.261 (100,0%)			

X^2=9,5

Tabla 6. *Riesgo de intoxicación por rodenticida en perros*

Especie	Rodenticida (n)	Otro agente (n)	Total (n)	OR	IC 95%	Valor p
Perro	224 (6,9%)	2.502 (76,7%)	2.726 (83,6%)	**2,30**	1,40-3,78	**<0,001**
Otra especie	20 (0,6%)	515 (15,8%)	535 (16,4%)			
Total	244 (7,5%)	3.017 (92,5%)	3.261 (100,0%)			

X^2=12,96

Tabla 7. *Riesgo de exposición a organofosforados, carbamatos y piretroides a través de vía de exposición cutánea.*

Agente	Vía cutánea (n)	Otras vías (n)	Total (n)	OR	$IC_{95\%}$	Valor p
Plaguicidas: organofosforados, carbamatos, piretroides	211 (6,5%)	1.794 (55,0%)	2.005 (61,5%)	**1,32**	1,02-1,70	**<0,05**
Otros agentes	103 (3,1%)	1.153 (35,4%)	1.256 (38,5%)			
Total	314 (9,6%)	2.947 (90,4%)	3.261(100%)			

X^2=*4,79*

observada en múltiples estudios en otros países [11, 12]. La mayoría de estas intoxicaciones se produjo por exposición a plaguicidas, lo que coincide con lo descrito en la literatura [11-15]. El envenenamiento accidental de animales domésticos con formulaciones comerciales de plaguicidas ha sido documentado en todo el mundo [11, 13, 16].

La familia de plaguicidas que destacó en este estudio fueron los rodenticidas, cuyo efecto es anticoagulante. Estos productos habitualmente se dejan en el suelo en lugares que se desea proteger de roedores, por esta razón es muy común que sean ingeridos por perros, comportamiento que ha sido documentado en múltiples ocasiones [11, 13, 17]. La ingestión accidental de estos agentes provoca en perros una variedad de efectos clínicos que incluyen anorexia, letargia, sangramiento, heces con sangre, disminución de la actividad, palidez de mucosas, edema de extremidades, hematuria, y disnea, entre otros [18]. Muchos de éstos caninos mueren producto de falta de atención veterinaria (principalmente perros sin dueños), ya que la ingestión suele ser inadvertida y la consulta tardía.

La tasa de supervivencia de los caninos después de la atención de apoyo de la intoxicación con rodenticidas anticoagulantes, transfusiones de sangre, y / o vitamina K ha sido reportada en un 83% de los casos [19]. El tratamiento de éstas intoxicaciones es complejo y extenso, ya que las coagulopatías requieren de hasta 8 semanas de tratamiento con vitamina K_1 [20]. Esto significa un gran costo afectivo y económico para los dueños de mascotas.

Otros plaguicidas destacados en el estudio por su frecuencia corresponden a piretroides y organofosforados/carbamatos. Estos dos grupos de insecticidas son ampliamente utilizadas en nuestro país como antiparasitarios de uso externo en jabones y champú de uso veterinario (con alta absorción cutánea) pudiendo generar

intoxicaciones por mal uso, contacto prolongado o ingestión involuntaria. La prevención de este tipo de exposiciones se basa principalmente en el uso apropiado de estos productos. Para ello es fundamental leer y seguir las indicaciones de uso que establece el fabricante. En las llamadas recibidas por el Centro, uno de los errores más comunes observados fue la mala dilución del producto. El riesgo de utilizarlos en una concentración mayor a la indicada, implica mayor penetración a través de la piel y membranas biológicas y con ello mayor riesgo de toxicidad sistémica. Otro inconveniente es el uso de producto para una determinada especie de animal en otra que no corresponde, por ejemplo aplicación de antiparasitario canino en un felino.

El principal mecanismo de exposición fue la ingestión de rodenticidas en perros, sin embargo, para otros plaguicidas como organofosforados, carbamatos y piretroides, la exposición se produjo principalmente por vía cutánea o dérmica. Estos productos son utilizados por los usuarios, sin saber que los organofosforados y carbamatos tienen absorción sistémica por vía cutánea, aumentando el riesgo de intoxicación y en el caso de los piretroides mayor riesgo de reacciones de tipo irritativas y de hipersensibilidad.

Es importante señalar que ciertos antiparasitarios se venden clandestinamente en ferias y pueden venir re-envasados, sin instrucciones de uso ni identificación del agente.

Otra familia importante de agentes descritos en este trabajo, que si bien no produjo un número elevado de intoxicaciones pero que sí puede ser peligrosa para las mascotas, son los medicamentos de uso humano. Estos agentes son una fuente importante de riesgo toxicológico para las mascotas así como lo son los productos químicos para el hogar y las plantas [13].

Las intoxicaciones representan sólo una parte de las actividades diarias del clínico veterinario, por lo que a este profesional le resulta difícil estar al tanto de nuevos conocimientos y avances científicos en el campo de toxicología animal [21]. Es por ello fundamental contar con el apoyo técnico para el manejo de estas emergencias. CITUC responde a esta demanda de conocimientos para el manejo de animales intoxicados.

La detección de tendencias en este ámbito es útil para guiar la formación y la educación continua de los veterinarios, técnicos veterinarios y otras personas involucradas en la prevención y el tratamiento de la intoxicación en animales de compañía. Datos de exposición de animales de compañía también proporcionan información indirecta de los patrones de uso de sustancias peligrosas por las personas en el ámbito doméstico, y refleja la percepción del público sobre qué sustancias utilizadas en este ámbito son considerados como peligrosas [3].

Conclusiones

Existe un importante riesgo de intoxicaciones en animales de compañía por exposición a tóxicos de fácil acceso presentes en el hogar tales como plaguicidas, agentes de uso doméstico general y medicamentos tanto de uso veterinario, como de uso humano. Algunos de estos pueden incluso provocar la muerte del animal.

El conocimiento sobre el peligro potencial de estos tóxicos juega un papel fundamental en la prevención de intoxicaciones en especies animales.

Los escasos datos de intoxicaciones en animales en Chile, hacen que sea necesario seguir investigando, además es fundamental mantener alertas respecto a la incidencia de casos con el fin de tomar las medidas preventivas correspondientes y guiar la formación y la educación continua de profesionales y técnicos del área veterinaria.

Bibliografía

1. Eleni C, Scholl F, Scaramozzino P (2014) Causes of death in dogs in the province of Rome. Vet Italy 50(2):137-43.
2. Cenerini A, Ciarrocca E, Di Nicola U, Fico R, González Ch (2012) Manual operativo para la gestión veterinaria de casos de presunto envenenamiento de animales salvajes y domésticos. Disponible en http://www.venenono.org/wp-content/uploads/2012/09/Manual_veterinario_espanol-1.pdf. Consultado en: 29/09/2015.
3. Mahdi A, Van der Merwe D (2013) Dog and cat exposures to hazardous substances reported to the Kansas state veterinary diagnostic laboratory: 2009–2012. J Med Toxicol 9(2): 207–211.
4. Programa Nacional de tenencia responsable de animales de compañía periodo 2014-2017. Subsecretaría de Desarrollo Regional y Administrativo Gobierno de Chile. Disponible en http://www.munitel.cl/noticias/Tenenciaresponsableanimales.pdf. Consultado en: 24/08/2015.
5. Ibarra L, Morales M, Acuña P (2003) Aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago, Chile. Av Cs Vet 18:13-20.
6. Roder J (2002) Manual de toxicología veterinaria, Multimédica Ed. Vet. San Cugat del Vallés, Barcelona pp 8-11.
7. Daza M, Ayuso E (2004) Intoxicaciones más frecuentes en pequeños animales. Rev AVEPA 24(4): 231-239.
8. Allen A (2003) The diagnosis of acetaminophen toxicosis in a cat. Can Vet J 44(6): 509–510.
9. Communication Record. Disponible en http://www.who.int/ipcs/poisons/intox_dms/en/. Consultado en 25/08/2015.
10. WHO. International Programme on Chemical Safety. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/en/ . Consultado en: 25/08/2015.
11. Navas I, Motas-Guzmán M, Maria-Mojica P, Romero D, Garcia-Fernandez AJ (1998) Intoxicaciones accidentales e intencionadas en perros y gatos en el sudeste de España (1994-1996). Rev Toxicol 15:110-113.
12. Maria-Mojica P, Romero D, Motas-Guzman M, Navas I, Garcia-Fernandez AJ (1998) Estudio retrospectivo de casos de envenenamientos de animales de compañía y aves en el sudeste de España. Rev Toxicol 15:105-109.
13. Sanchez-Barbudo IS, Camarero PR, Mateo R (2012) Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y doméstica de España: Diferencias entre comunidades autónomas. Rev Toxicol 29:20-28.
14. Martines-Haro M, Mateo M, Cardiel I, Reglero MM, Guitart R (2006) Intoxicaciones por plaguicidas anticonlinesterásicos en fauna cinegética y sus depredadores silvestres. Rev Toxicol 23: 39-43.
15. Gray A (2000) Permethrin toxicity in cats. Vet Record. 147:556.
16. Giorgi M, Mengozzi G (2011) Malicious animal intoxications: poisoned baits. Vet Med (Praha) 56(4):173–179.
17. Fitzgerald K, Bronstein A (1987) Comparison of first and second generation anticoagulant rodenticide poisonings - fourteen canine cases. Vet Hum Toxicol 29:476.
18. MICROMEDEX(R) Healthcare Series Vol. 165 expires 9/2015 ANTICOAGULANTS-LONG ACTING. Citada en: 25/08/2015.
19. Sheafor S, Couto C (1999) Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. J Am Animal Hosp Assoc 35:38-46.
20. Hall F (1990) Prolonged coagulopathy associated with brodifacoum poisoning in two dogs. J Small Anim Pract 31(11):574-579.
21. Novoa M, Melgar M, García M, Alonso J, Pérez-López M (2012) Análisis de la casuística del Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe) en el período 2001-2007. Rev Toxicol 29: 29-35.

Caracterización química del material particulado PM_{10} de la zona urbana de Cuenca- Ecuador e investigación de su genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo en células epiteliales alveolares A549

Astudillo Alemán AL[1], Ramírez Orellana MI[2], García Alvear NB[1], González Arévalo GJ[2], Gutiérrez Valle IA[2], Bailón Moscoso NC[2]*

[1]*Centro de Estudios Ambientales, Universidad de Cuenca (CEA), Cuenca-Ecuador.*

[2] *Departamento de Ciencias de la Salud, Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja, Loja-Ecuador.*

Resumen: La exposición a partículas ambientales es un factor de riesgo que ocasiona daños en la salud humana, como trastornos respiratorios, cardiovasculares y cáncer. La toxicidad y el efecto inflamatorio de estas partículas están relacionados con su tamaño y características químicas. El objetivo de este estudio fue determinar las características químicas de la fracción hidrosoluble de Material Particulado PM_{10}, recolectado en tres sitios de monitoreo de la ciudad de Cuenca-Ecuador, y evaluar su actividad genotóxica e inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular epitelial alveolar humana A-549. Las muestras fueron recolectadas empleando un equipo de bajo volumen. Las concentraciones de material particulado determinadas por análisis gravimétrico superaron en los tres puntos de estudio los 50 $\mu g/m^3$, límite estipulado en la Legislación Ecuatoriana. En la caracterización de la solución acuosa se determinó la presencia de aniones (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{-2}) y metales pesados (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Mn), mediante técnicas de cromatografía iónica y espectroscopía de absorción atómica respectivamente; SO_4^{-2} y Fe presentaron las mayores concentraciones. Las células A-549 fueron expuestas a diferentes concentraciones (0,82; 1,25 y 1,63 m3/mL) de la fracción hidrosoluble de PM_{10}, con la finalidad de observar el posible efecto genotóxico mediante el ensayo del cometa y la inducción de especies reactivas de oxígeno mediante fluorimetría. Finalmente se determinó que los extractos acuosolubles de PM_{10} inducen daño celular bajo (tipo I), e incrementan la producción de ROS en células A-549, lo que pudiera constituir un riesgo en la salud de la población expuesta.

Palabras claves: genotoxicidad, PM_{10}, ensayo del cometa, ROS, Cuenca-Ecuador.

Abstract: Chemical characterization and study of the genotoxicity and induction of oxidative stress of particulate material PM_{10} from the urban area of Cuenca –Ecuador. Exposure to environmental particles is a risk factor that causes damage to human health, such as respiratory and cardiovascular diseases and cancer. The toxicity and inflammatory effects of these particles is related to their size and chemical characteristics. The aim of this study was to determine the chemical characteristics of the aqueous fraction of Particulate Matter PM_{10}, collected in three monitoring sites Cuenca-Ecuador, and to evaluate their genotoxic activity and induction of reactive oxygen species (ROS) in human alveolar epithelial cell line A-549. Samples were collected using a low volume equipment. Particulate matter concentrations determined by gravimetric analysis in the three study points exceeded the 50 ug / m^3 limit stated in the Ecuadorian legislation. In the characterization of the aqueous solution the presence of anions (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{-2}) and heavy metals (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Mn) was determined by ion chromatography techniques and atomic absorption spectroscopy, respectively; $SO4^{-2}$ and Fe showed the highest concentrations. The A-549 cells were exposed to different concentrations (0.82, 1.25 and 1.63 m^3 / mL) fraction of water-soluble PM10, in order to observe the possible genotoxic effect by the comet assay and the amount inducing reactive oxygen species by fluorimetry. It was finally determined that the aqueous -soluble extracts of PM10 induce cell damage under (type I), and increase the production of ROS in cells A-549, which could pose a risk to the health of the exposed population of the city of Cuenca

Keywords: genotoxicity, PM_{10}, comet Assay, ROS, Cuenca-Ecuador.

Introducción

La contaminación ambiental se ha considerado un tema de preocupación social, ya que numerosos estudios han demostrado que la exposición a material particulado atmosférico (MP) tiene fuertes asociaciones con impactos significativos en la salud humana, y pueden inducir enfermedades cardiovasculares [1], respiratorias [2], y trastornos neurodegenerativos. El MP contiene compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) [3] y sus derivados, metales pesados, óxidos de azufre y de nitrógeno [4]. Se postula que los efectos adversos de las partículas atmosféricas provienen de la inducción de estrés oxidativo en la células, que inicia con la formación de especies reactivas de oxigeno (ROS), capaces de inducir cambios en ciclo redox celular y por tanto desencadenar una serie de eventos en cascada como la inflamación, apoptosis y daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [5]. Actualmente, por convención internacional se encuentran reguladas y consideradas como contaminantes críticos, las partículas suspendidas PM_{10} ($\leq$ 10 µm) y $PM_{2.5}$ ($\leq$ 2.5 µm), por su presunta contribución en la mortalidad y morbilidad por afecciones a largo plazo como el decremento en la función pulmonar y cáncer [6]. En el Ecuador, en el año 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) atribuyó 807 defunciones a causa de la contaminación del aire. Según *Ambient (outdoor) air pollution in cities database 2014*, [7]. Cuenca es la cuarta ciudad del Ecuador con mayor índice de material particulado suspendido en el aire urbano. Esto es debido al creciente desarrollo de la industria local y de su parque automotor, del cual se estima una proyección de crecimiento de 10.000 vehículos por año. En la presente investigación se caracterizó químicamente la fracción acuosoluble del material particulado PM_{10}, recolectado en tres puntos estratégicos de la ciudad de Cuenca, y se evaluó sobre la línea celular epitelial alveolar humana A-549, el efecto genotóxico mediante el ensayo del cometa, el cual es un método rápido, económico y sensible [8] y se cuantificó los ROS, a través de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA), una de las técnicas ampliamente utilizada para medir directamente el estado redox de una célula [9]

Material y métodos

Reactivos y materiales

Fluorosein diacetato (FDA), Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFDA) Dimetilsufóxido (DMSO), Triton 100X y HBSS (Solución salina equilibrada de Hank's) fueron adquiridos a Sigma Chemical

*e-mail: anilua33@hotmail.com

Co. Ltd. Agarosa de normal punto de fusión (NMA), Acido etilenediaminetetraacetico (Na-EDTA), RPMI medio, antibiótico y antimicótico 100X, L.- glutamina, ultra pura, tris, suero fetal bovino y tripsina fueron adquiridos a GIBCO TM Invitrogen Corporation (USA). Hidróxido de Sodio, Cloruro de Sodio, metanol y bicarbonato de sodio fueron proporcionados por Merck KGaA (Germany). Agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y bromuro de etidio 10mg/mL provienen de Promega Corporation (USA). Frascos plásticos para cultivo celular y microtubos fueron adquiridos a Axygen and Nunc. Los filtros de ester celulosa fueron proporcionados por Merck millipore.

Selección de los sitios de monitoreo

La selección de los puntos de monitoreo se hizo en base a las conclusiones de un estudio previo, desarrollado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca en el año 2006, donde se demuestra los altos niveles de material particulado PM_{10} presentes en la ciudad, y se estableció las zonas de mayor generación [10]. Se seleccionaron tres puntos que se consideraron representativos cuyas coordenadas geográficas son: el P1 (2°53'39.31"S, 79°0'4.62"O), se encuentra localizada en un área cuyo uso de suelo está designado a la gestión y administración, comercio, servicios generales y vivienda. Este punto se ubicada en el Centro Histórico de la ciudad, el mismo que se caracteriza por presentar altas emisiones de vehículos y poca vegetación. El punto P2 (2°54'02.91"S, 79° 0'52.30"O), representa una zona principal de ingreso al Centro Histórico, es considerada una zona de alto flujo vehicular. Se caracteriza por ser un área de gestión y administración, comercio, servicios generales y vivienda. P3 (2°55'10.04"S, 79°03'8.07"O) cuyo uso de suelo esta designado a la vivienda.

Recolección de las muestras

Se empleó un equipo de muestreo de bajo volumen (Low Vol de F y J modelo LV-2), con un flujo constante de 100L/min, para filtrar 6m^3 de aire por hora. Para la recolección se emplearon filtros de membrana de éster celulosa con diámetro de poro de 0,8 micras. El equipo de monitoreo fue instalado a una altura de 3 metros sobre el nivel del suelo. Se realizaron dos fases de monitoreo por cada punto de estudio, recolectando en cada fase treinta filtros, los cuales fueron colocados diariamente, durante un tiempo de exposición de seis horas, durante sesenta días en cada punto, de lunes a viernes en consideración a que la actividad humana en la ciudad y el incremento del movimiento vehicular se inician aproximadamente a las 06:00 horas y dura aproximadamente hasta las 20:00 horas.

La concentración de las partículas ($\mu g/m^3$) fue determinada por análisis gravimétrico, previa estabilización de los filtros (40% - 45% de humedad relativa y temperatura de entre 15ºC y 30ºC) pesando antes y después de la recolección [11].

Corrección de la concentración

Se emplearon datos de temperatura y condiciones ambientales de la estación meteorológica del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca para llevar a cabo la corrección de la concentración, como lo señala la norma ecuatoriana en el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria [12].

Caracterización del PM_{10}

Mediante muestreos aleatorios, se seleccionó diez muestras de PM_{10} de cada fase del monitoreo. De las muestras seleccionadas, cinco se emplearon para la determinación de metales pesados (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd, Mn) y cinco para el análisis de aniones (Cl^-, NO^{3-} y $SO4^{-2}$). El método analítico empleado para determinar la presencia de metales en los filtros fue el NIOSH 7082 (por espectroscopía de absorción atómica), que consiste en el ataque ácido del filtro hasta disolución total del mismo y completa solubilización de los metales, aforo a un volumen conocido, homogeneización y lectura en el equipo de absorción atómica [13]. Para la determinación de aniones se empleó el método adaptado de referencia EPA 330.1[14], que emplea un volumen determinado de muestra acuosa, usualmente 5ml son filtrados por un micro filtro de celulosa de 0,45µm. Un mililitro de este filtrado es analizado con cromatografía líquida de alta eficiencia con una columna en fase reversa. Para cualificar y cuantificar los aniones se elaboraron curvas de calibración de diferentes rangos. Los aniones se analizaron mediante cromatografía liquida iónica, primero los aniones fueron separados en la columna, y posteriormente analizados con el detector de conductividad. Para el caso de los filtros de material particulado se usó una cantidad determinada de muestra, la misma que se obtuvo de varios lavados con de agua desionizada, esta solución sigue el procedimiento normal de análisis con el equipo y técnica antes mencionada.

Extracción de la fracción acuosa de las partículas

El material particulado contenido en los filtros se extrajo con agua ultra pura, por ultrasonicación durante 15min a temperatura ambiente, empleando un ultrasonido marca Cole-Parmer 8894. Por cada fase de monitoreo se obtuvieron 40 mL de solución o extracto acuoso, el mismo que corresponde al lavado de veinte muestras. Posteriormente el extracto acuoso fue centrifugado a 2500 g durante 30 min para sedimentar la materia insoluble. Las soluciones frescas preparadas fueron almacenadas a 4˚C para su posterior empleo en el ensayo de genotoxicidad y ROS.

Modelo celular y dosis

Para los ensayos biológicos se utilizó la línea celular humana de pulmón A-549, que fue cultivada en medio base de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina (2 mM) y 1% antibiótico-antimicótico (100 Unidades/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de amphotericina B). El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO_2, con un tiempo de duplicación de 24 h. Las células fueron expuestas a tres concentraciones distintas (0,82, 1,25 y 1,63 m^3/mL) de MP. Como control positivo, se usó peróxido de hidrógeno 1 µM para la producción de ROS y etilmetanosulfonato (EMS) 2 µM para ensayo del cometa. Además se trabajó como control negativo, las células con el agua destilada donde se disolvieron las partículas a una concentración de 1.63 m^3/mL.

Ensayo de citotoxicidad por FDA/BrEt (Viabilidad celular)

Para realizar el ensayo de doble tinción FDA/BrEt [8] se sembraron las células en placas de 6 multipocillos , con un total de 2 x10^5 células/pocillo, se incubó durante 24 horas, transcurrido este periodo se adicionaron los tratamientos. Luego de 24 horas de exposición se cultivaron por 24 horas más, y se procedió a realizar el ensayo de viabilidad según protocolo descrito por Jones y Senft [15], con ligeras modificaciones. A la suspensión celular se adicionó una solución de diacetato de fluoresceína (FDA; 5mg/mL) – bromuro de etidio (EtBr; 0,2mg/mL). Se contabilizaron 200 células por placa cada una por duplicado y se analizó en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus).

Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno por Fluorometría

Para la evaluación de la producción de estrés oxidativo se utilizó diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador de especies reactivas de oxígeno [9] Para la realización de los ensayos se sembró 1x10^4 células/pocillo en multipca de 96 pocillos, en medio de cultivo RPMI suplementado, se incubó durante 24 horas, transcurrido este tiempo, las células fueron incubadas con 200 µL de DCFDA 40 µM en solución salina de Hank's (HBSS) y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se expuso las células a las concentraciones de material particulado (PM_{10}) y sus controles. Se incubó la placa por 2 horas a 37°C. La fluorescencia DCFDA se midió después de la exposición en un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation) a una λex: 485nm y λem: 528 nm. El estrés oxidativo se cuantificó en función a la intensidad de fluorescencia relativa proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno.

Determinación de daño genotóxico mediante ensayo del cometa in vitro en células A-549

El protocolo para el ensayo cometa se fundamentó en el descrito por Tice, la versión alcalina [8], adaptado a las condiciones del laboratorio. Se realizaron tres ensayos independientes cada una por duplicado incluido los controles. Para la cuantificación del daño genotóxico se evaluó la migración del ADN contabilizando visualmente 50 cometas por placa, en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) con el objetivo 40x. Con estos resultados se procedió a establecer categorías de daño celular en base a lo establecido por Carballo [16] , en la cual se consideran de 4 a 5 categorías de acuerdo con en el largo de cola del cometa: Categoría I: bajo (<20µm); Categoría II: medio (20-40µm); Categoría III: alto (40-80µm) y Categoría IV: células totalmente dañadas (>80µm).

Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes cada uno por duplicado (ensayo cometa y viabilidad) o triplicado (ROS por fluorometría) para cada concentración. El análisis estadístico para los ensayos de viabilidad y determinación de ROS se realizó mediante el análisis estadístico de varianza (ANOVA), seguido del test Dunnet. En el caso del ensayo genotóxico se aplicó el estadígrafo de Kruskal-Wallis, el test de rangos de Mann Whitney y Dunnett, usando los programas estadísticos SPSS y GraphPad Prism 5.

Las concentraciones de material particulado PM_{10} registradas en los tres sitios de estudio sobrepasan los 50 µg/m^3, valor establecido como límite en la Normativa Nacional Ecuatoriana [12]. Cabe indicar que este límite se toma únicamente como referencia ya que el monitoreo se realizó por períodos inferiores a 365 días tal como lo indica la normativa. Las mayores concentraciones de PM_{10} se registran en el punto P3, seguido del punto P2 y finalmente el punto P1 (Figura 1A).

Caracterización del material particulado

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de los cationes y aniones determinados en las muestras de PM_{10} recolectadas en los sitios de monitoreo, durante la primera y segunda etapa respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 1 el elemento en mayor concentración en los tres puntos de estudio en ambas etapas de monitoreo es el Fe, con una variación de 1888,88 ηg/m^3 en el punto P1 y 3180,55 ηg /m^3 en el punto P3, en la primera etapa, en la segunda etapa, con una concentración mínima de 3981,11 ηg/m^3 en el punto P1 y una concentración máxima de 4777,77 ηg/m^3 en el punto P2. Nuestros resultados muestran que las concentraciones registradas para los metales Mn, Zn, Cu y Ni en las dos etapas oscilan entre 26,83 y 274,05 ng/m^3. Sólo en el P1, de la primera etapa fue posible establecer la concentración de Ni; los elementos Cr y Cd no fueron detectados por el equipo de absorción atómica en tres puntos de monitoreo en las

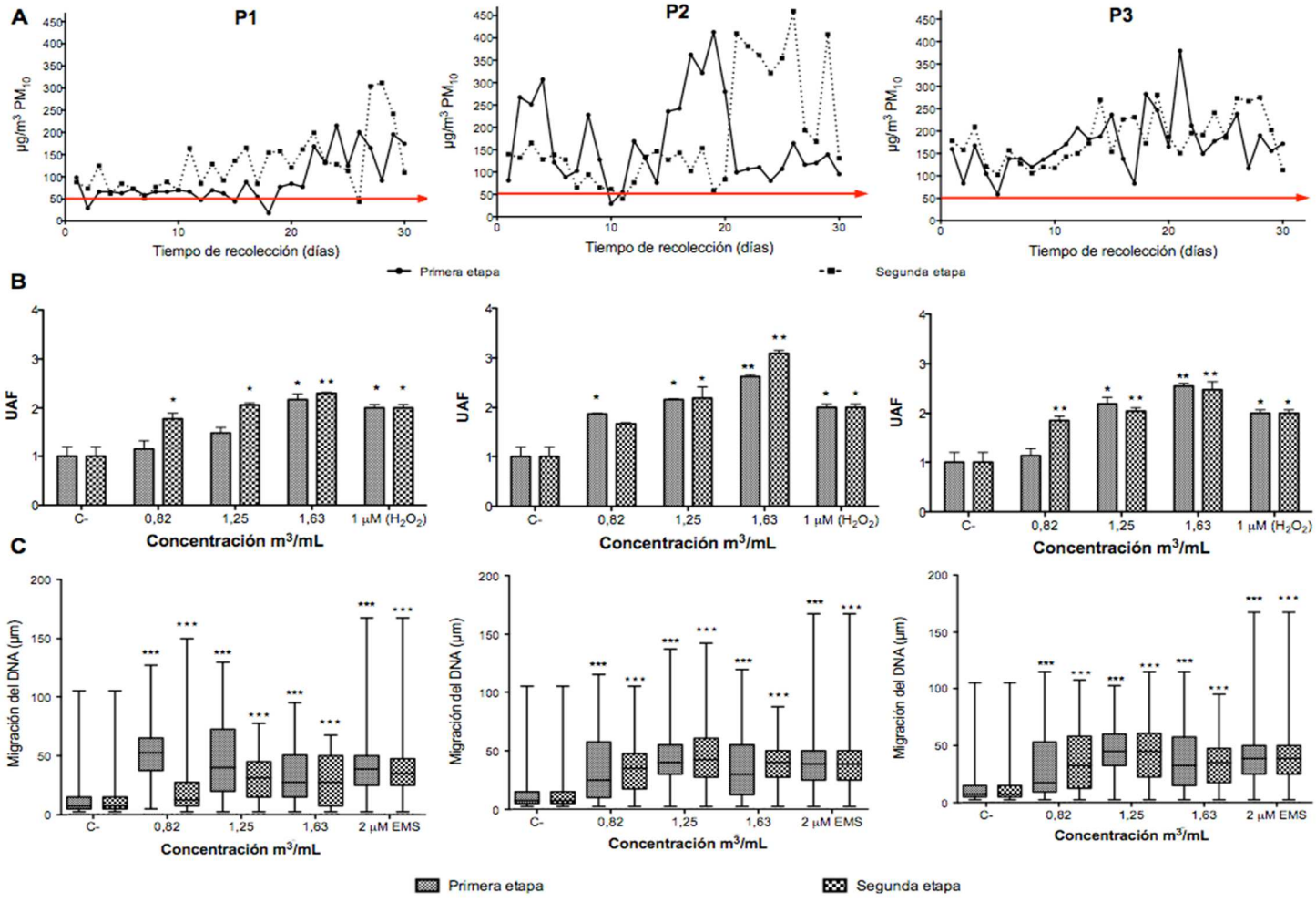


Figura 1: Concentración de PM_{10} y efecto inductor de ROS y genotóxico. **A** Representa la concentración de PM_{10} recolectado en los tres puntos de monitoreo de la Ciudad de Cuenca-Ecuador. La línea en 50 µg/m^3, representa el límite permitido por la Normativa Nacional Ecuatoriana. **B** Determinación de inducción de ROS en la línea celular A549, cada barra representa la media de tres ensayos independientes cada uno por triplicado ± el error estándar. Test ANOVA y post test Kruskal- Wallis (*p<0,01; **p< 0,005, ★ p<0,01; ★★ p<0,005). **C** Efecto genotóxico del PM_{10} sobre la línea celular A-549, medido del ensayo del cometa. Test Kruskal - Wallis y post test Dunnet. Cada dato representa la media de tres experimentos independientes por duplicado ± error estándar (***p< 0,0001; ★★★p< 0,0001)

Resultados

dos etapas, probablemente debido a que el límite de detección de estos

elementos de acuerdo al método es superior a los que pudieron haber existido en las muestras analizadas de material partículado PM_{10}.

En cuanto a los aniones, en la primera etapa, los aniones $SO4^{-2}$ se presentan en mayor concentración en los tres puntos de estudio, registrándose un máximo de 781,95 ηg/m^3 en el punto P3 y un mínimo en el punto P1 con una concentración de 28,66 ηg/m^3. Los aniones nitrato registran valores de concentración superiores a los Cl^-, con un concentración máxima en el punto P3 de 710,77 ηg/m^3 y una concentración mínima de 19,94 ηg/m^3 en el punto P1. Durante la segunda etapa en P1 se registra las mayores concentraciones de NO^{-3} y $SO4^{-2}$, mientras que las mayores concentraciones de aniones cloruros se registran en el punto P3.

Tabla 1. *Concentraciones de metales pesados y aniones presentes en las muestras de PM_{10} recolectadas en los puntos de monitoreo (Primera y Segunda Etapa)*

Etapas	Muestras	Concentración de metales pesados (ng/m^3)						Aniones (ng/m^3)		
		Fe	Mn	Cu	Ni	Cr	Cd	Cl^-	NO^{3-}	$SO4^{-2}$
Primera etapa	P1	1888,9	36,1	175,9	26,83	N.C*.	N.C.	2,88	19,94	28,66
	P2	2801,8	57,4	22,22	N.C.	N.C.	N.C.	81,60	672,5	780,0
	P3	3180,6	60,2	10,16	N.C.	N.C.	N.C.	229,77	710,8	781,95
Segunda etapa	P1	3981,1	75,9	22,22	N.C.	N.C.	N.C.	154,54	944,8	1323,3
	P2	4777,8	119	25,88	N.C.	N.C.	N.C.	77,36	405,8	1030,6
	P3	4722,7	88,9	12,94	N.C.	N.C.	N.C.	265,48	786,1	1008,8

N.C. = No cuantificado

Tabla 2. *Porcentaje de viabilidad de las células A549, tratadas con diferentes dosis de la fracción acuosoluble de PM_{10}.*

Dosis	% de viabilidad ± Desviación Estándar					
	P1(I etapa)	P1(II etapa)	P2(I etapa)	P2(II etapa)	P3(I etapa)	P3(II etapa)
EMS 2µM	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10	96,83±1,10
C (filtro blanco)	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67	97,01±2,67
0,82m^3/mL	96,32±4,20	95,62±4,09	93,78±4,4	94,61±3,4	96,82±2,1	92,83±4,2
1,25m^3/mL	95,09±4,20	93,55±6,1	94,87±3,1	94,23±5,2	91,52±5,1	94,30±2,9
1,63m^3/mL	89,55±10,36	92,56±4,9	93,25±4,2	94,69±4,0	93,10±5,1	92,08±9,06

Determinación de ROS inducido por el PM_{10}

En la Figura 1B se muestran los resultados obtenidos después de 2 horas de exposición con las diferentes dosis de PM_{10} correspondiente a las etapas 1 y 2 sobre la línea celular A549.

Se puede observar que la cantidad de especies reactivas de oxígeno medidas en unidades arbitrarias de fluorescencia, incrementan significativamente conforme aumenta la concentración con respecto a su control negativo, así mismo se observa mayor respuesta en la producción de ROS en la segunda fase en comparación con los datos obtenidos en la primera fase, al parecer esto es independiente de la naturaleza química de las mismas pero dependiente de la concentración total de metales.

Porcentaje de viabilidad celular

Mantener un alto porcentaje de viabilidad es importante para los estudios de genotoxicidad, ya que un índice inferior al 70%, produce que los valores encontrados por el ensayo del cometa se incrementen por un efecto de las células muertas y no por la genotoxicidad propia de los compuestos prueba. En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de viabilidad celular de las dosis probadas (0,82, 1,25 y 1,63 m3/mL) y en sus respectivos controles. La viabilidad celular es superior al 90% en todos los casos.

La medición del largo del cometa, indica que en los tres puntos de monitoreo existe un incremento de daño al DNA, tanto en la primera como en la segunda etapa, aunque no se observa un efecto dosis dependiente (Figura 1C). Al analizar estos datos de acuerdo a la escala cualitativa de daño, en los tres puntos de monitoreo se observa un daño de tipo I (Tabla 3).

Tabla 3. *Categorización del Daño al DNA en células epiteliales alveolares A549, expuestos a diferentes dosis de material particulado PM_{10} de la ciudad de Cuenca.*

Puntos de monitoreo	Tratamiento	Media ±DS	Tipo de daño			
			I	II	III	IV
Punto P1 (Primera Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19	2
	0,82m^3/mL	51±20	19***	62	148	21
	1,25m^3/mL	48±31	65***	66	73	46
	1,63m^3/mL	33±21	105***	54	87	4
Punto P1 (Segunda Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19	2
	0,82m^3/mL	29±30	164***	19	42	25
	1,25m^3/mL	31±19	97***	77	76	0
	1,63m^3/mL	30±20	90***	51	59	0
Punto P2 (Primera Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19**	2
	0,82m^3/mL	47±35	83***	40	78	49
	1,25m^3/mL	34±17	66***	104	77***	3
	1,63m^3/mL	48±33	76	41	86	47
Punto P2 (Segunda Etapa)	EMS (2µM)	40±26	56	91	91	12
	C-(Filtros Blanco)	15±18	167**	12	19	2
	0,82m^3/mL	43±29	84***	59	71	36
	1,25m^3/mL	59±28	28***	37	137	48
	1,63m^3/mL	39±26	88***	37	111	14

*Categoría I: bajo; II: medio; III: alto y IV: células totalmente dañadas (ANOVA** p<0,001; ***p<0,0001).*

Discusión

En los puntos de monitoreo P1, P2 y P3 en donde se analizaron las concentraciones de PM_{10}, no es posible realizar comparaciones con la Normativa Ecuatoriana, ya que la misma establece un período anual de monitoreo, sin embargo para tener un valor de referencia si se comparó con la concentración máxima permisible de 50 µg/m^3 que establece la Legislación Ambiental como promedio anual, las concentraciones promedio de PM_{10} en los sitios de monitoreo superan el patrón establecido en la normativa nacional [17]. Las variaciones de las concentraciones de metales pesados en las muestras de material particulado PM_{10}, estarían condicionadas al uso de suelo donde se realizó el monitoreo y la elevada densidad del tráfico. Actualmente no existe en la legislación ecuatoriana límites de las concentraciones másicas de metales pesados en aire ambiente para la protección de la salud humana por inhalación de estas partículas, la OMS dispone para Cd (5 ng/m^3) y Mn (150 ng/m^3), y la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades de los Estados Unidos (*ASTDR*, por sus siglas en inglés), para Cr la concentración debe oscilar entre 0-30 ng/m^3, para el Cu el límite estipulado es de 1-200 ng/m^3, para el Ni el valor fluctúa entre 7-12 ng/m^3, para el Zn el valor guía oscila entre 100-1700ng/m^3, y para el Fe no se reportan valores y en nuestro estudio es el componente mayoritario. Comparando los resultados obtenidos con estás normas, los metales Mn, Cu, Zn estarían dentro de los parámetros establecidos. El Ni, en el punto P1 excede los niveles de la ASTDR durante la primera etapa de monitoreo, no fue posible cuantificar Ni en otros puntos de monitoreo al igual que Cd y Cr en los tres puntos, probablemente por limitante de detección del método, sería recomendable estudios posteriores que permita establecer con mayor precisión su concentración. Aunque la mayoría de metales cumplan con las normas permitidas, en muchas ocasiones

el efecto de las mezclas de metales incrementan los riesgos en la salud debido a una posible sinergismo en su toxicidad, incluyendo la genotoxicidad y procesos carcinogénicos [18]. Las concentraciones más elevadas de aniones, en las muestras de material particulado PM_{10} recolectadas en la ciudad de Cuenca, corresponden al ion sulfato, seguido de nitratos y finalmente de iones cloruro. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados en Quito, la ciudad capital de Ecuador [19], en áreas con alto tráfico vehicular, representando los iones un total del 25 % de los componentes presentes en el material particulado de esta ciudad. Los metales hallados en las muestras de PM_{10} del aire de la ciudad de Cuenca como el Ni, Cu y Fe, los mismos que pueden promover la formación de lesiones oxidativas [20], inducir citotoxicidad y potencial pro inflamatorio en las vías respiratorias; estos efectos se han asociado con estrés oxidativo, debido al potencial oxidante de componentes solubles, como los metales de transición asociados a las partículas atmosféricas [20,21], por lo que estos metales podrían estar implicados en la producción de ROS observada y que es independiente de la composición química observada, ya que probablemente actúan de manera similar. El Fe es señalado como un irritante local para los pulmones y el tracto gastrointestinal al ser inhalado y casos de exposición prolongada a una mezcla de polvo de Fe y otros metales, la función pulmonar se ha visto comprometida [21, 22]. Mientras que el Zn se encuentra incluido en el grupo D, no clasificable respecto a su actividad cancerígena, por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*US – EPA* por sus siglas en ingles), ya que tanto la evidencia obtenida en personas como en animales se considera inadecuada [23]. En cuanto al Mn, se manifiesta que su absorción a través de la piel puede considerarse despreciable, sin embargo la intoxicación crónica por manganeso puede tener manifestaciones nerviosas o pulmonares [21].

La citotoxicidad observada es menor al 10 %, en todos los tratamientos, lo que indica que la exposición al material particulado estaría relacionada con procesos crónicos en los que no se ve comprometida la viabilidad pero que pueden desencadenar en enfermedades a largo plazo, incluido cáncer, el cual está relacionado con lo observado en el ensayo del cometa donde se observa un daño de tipo I. Las muestras acuosolubles de PM_{10} recolectadas en el punto P1, P2 y P3 durante las dos etapas de estudio, inducen daño genotóxico en las células epiteliales alveolares A549, medido por la migración del DNA de las células (largo de cola del cometa). En el punto 2 y el punto 3 se evidencian un incremento en la migración del ADN en la segunda fase, y es donde existe una mayor inducción de ROS. A pesar de que en el punto P3 se determinaron las mayores concentraciones de PM_{10}, no es el de mayor daño celular, ya que el efecto observado dependería más de los mecanismos de acción de los componentes y la interacción entre ellos que de la concentración. Siendo por lo tanto, la caracterización de la composición un elemento crucial en la evaluación sobre los efectos en la salud [20]. Existen diferencias entre los efectos genotóxicos y las características químicas del material particulado de diferentes localidades, evaluados tanto en ensayos acelulares como en cultivos celulares, sugiriendo que la composición química del material particulado heterogéneo se debe muy probablemente a las fuentes locales y de allí que no se observe un efecto genotóxico dosis dependiente [6], pero además seria importante también identificar los compuestos aromáticos procedentes de la combustión vehicular.

Conclusiones

Las concentraciones de PM_{10} de la ciudad de Cuenca sobrepasan a las permitidas por la legislación ecuatoriana, siendo en la zona Sur-este (P3) la de mayor contaminación. El aire ambiente de la ciudad de Cuenca, tiene como parte de su composición metales pesados (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni), y aniones (Cl^-, NO_3^- ; SO_4^{2-}). En los puntos de monitoreo el Fe y $SO4^{2-}$, son los más abundantes. Los metales pesados encontrados, podrían estar relacionados tanto en el incremento de la producción de ROS como en el daño genotóxico, evidenciado en las células epiteliales alveolares A-549 a 24 horas de exposición un daño genotóxico de tipo I, por lo que es necesario otros estudios de evaluación de riesgo de la población de la zona que estaría expuesta a largos tiempos de exposición al PM.

Agradecimiento

El presente estudio se ha desarrollado en el contexto del Convenio Específico de Cooperación del Proyecto: Estudio de genotoxicidad del material particulado PM_{10} de la zona urbana del Cantón Cuenca, financiado por el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca y la Universidad Técnica Particular de Loja, proyecto número PROY_FIN_CCSAL_0004.

Bibliografía

1. Shah AS , Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, Newby DE, Mills NL (2013) Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. Lancet 382: 1039–1048.
2. Gutierrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Puerto M, Sanchez-Granados E, Grillo A, Camean AM (2009) Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanoparticulas. Rev. Toxicol 26: 87–92.
3. Callén MS, Iturmendi A, López JM, Mastral AM (2014) Source apportionment of the carcinogenic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) associated to airborne PM10 by a PMF model. Environ Sci Pollut Res 21: 2064–2076.
4. Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD (2002) Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. 287: 1132-1141.
5. Li N, Xia T, Nel AE (2008) The role of oxidative stress in ambiente particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. Free Radic Biol Med 44:1689-1699.
6. Sahagún MA (2010) Efecto genótoxico de las particulas urbanas. Tesis Doctoral. Centro Interdisciplinario de Investigaciones y estudios sobre medio ambiente y desarrollo CIIEMAD Instituto Politécnico Nacional, México.
7. World Health Organization (2014). Ambient Air Pollution Database, 2014. Disponible en www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/cities/en/ (revisado Septiembre 2014)
8. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J C, Sasaki Y F (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 35:206–21.
9. Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. Free Radic Biol Med 43: 995–1022.
10. Jachero L, Moscoso D (2009) Evaluación del riesgo de exposición a sustancias tóxicas procedentes de la contaminación atmosférica en la ciudad de Cuenca. Contaminación del Aire. Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, Cuenca. pp. 20.
11. Balcarce E (2009) Manual de procedimientos para determinación de material particulado. Disponible en: http://web.minsal.cl/portal/url/item/80bf098d5a137083e04001011e015e8d.pdf (revisado Septiembre 2014)
12. Ministerio del Ambiente República del Ecuador Registro oficial No 464 (2011) Disponible en: http://www.efficacitas.com/efficacitas_es/assets/AM%20050%20Norma%20calidad%20aire%20ambiente%20(2).pdf (revisado Septiembre 2014).
13. L'vov BV (1961) The analytical use of atomic absorption spectra.

Spectrochim Acta 17:761–770.

14. Hautman DP, Munch DJ (1997) Method 300.1 Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. 300.1-1-300.1-36.
15. Jones KH, Senft JA. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. J Histochem Cytochem 33:77–79.
16. Carballo M A, Cortada C M, Gadano A B, (2005) Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Theoria 14:95–108.
17. Vallejo MA (2011) Normas de calidad de aire ambiente, libro VI. Normas Tec. para la Prev. y Control la Contam. Ambient. para Sect. Infraestruct. Quito- Ecuador, p 9
18. Martín SA, Emilio R, Mahara V (2011) Role of oxidative stress in transformation induced by metal mixture. Oxid Med Cell Longev 2011: 935160.
19. Dias-Suárez V, Páez-Pérez C (2006) Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras. Acta Nova 3:308–322.
20. Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruíz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P (2006) Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. Environ Mol Mutagen 47:199–211.
21. Nordberg G (2001) Metales: propiedades químicas y toxicidad. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf (revisado Septiembre 2014)
22. Grau MD (2003) Toxicología Ambiental: Evaluación del riesgo para la salud humana. McGraw-Hill interamericana España. Madrid.198-235.
23. Agency United Stated Enviromental Protection (2000) Toxicity data by category for chemicals listed under epcra section 313. Disponible en: http://www2.epa.gov/sites/production/files/documents/hazard_categories.pdf (revisado Septiembre 2014)

Rev. Toxicol (2015) 32: 127-130

Impacto de las actividades antrópicas derivadas de la industria petrolera en relación con la presencia de metales pesados en la ganadería bovina colombiana

Bustamante JJ[1]*, Chaparro AL[2], Peláez MJ[3]

1Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona, Colombia.

2Departamento de Biología-Química, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona, Colombia.

3 Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. Centro de Sanidad Vegetal-CISVEB. Universidad de Pamplona, Barrio el Buque, Pamplona, Colombia.

Resumen: La región del Magdalena medio es una zona de actividad industrial-minera con exploraciones y refinación de hidrocarburos. Por ello los animales que viven en esta área geográfica son afectados por la presencia de contaminantes, especialmente metales pesados. En este trabajo se estudiaron 40 animales adultos, sacrificados en el matadero de Barrancabermeja, procedentes de explotaciones bovinas cercanas a industrias con actividad petrolífera. Se determinó la presencia de plomo, cadmio, molibdeno y zinc en hígado, riñón, músculo y piel mediante espectrofotometría de absorción atómica y se compararon los resultados obtenidos con los límites máximos permisibles establecidos por la Unión Europea y el Codex Alimentarius [1,2]. Se encontró mayor concentración de todos los metales en Barrancabermeja excepto el Zn que presentó mayores niveles en Yondó. Un número importante de muestras hepáticas (90 y 50%), renales (75 y 15%) y musculares (85 y 90%) de ambas localizaciones superaron los valores permisibles de Pb tanto del Codex Alimentarius, como de la Unión Europea. Situación similar sucede con el Cd en Barrancabermeja, superando en el 85%, el 10% y la totalidad (100%) los valores permitidos por la Unión Europea en hígado, riñón y músculo respectivamente, mientras que en Yondó, 65% de las muestras hepáticas y todas las muestras musculares superan esos mismos límites. Por ello podemos concluir que el consumo de carne y vísceras de bovinos que pastorean en el Magdalena Medio Colombiano, representa un grave riesgo para la salud humana como consecuencia de su alto grado de contaminación con metales pesados.

Palabras claves: Bovinos, industria petrolera, metales pesados, pastoreo, vísceras.

Abstract: Middle Magdalena region is an area with an industrial-mining with exploration and refining of oil. Therefore the animals that live in this geographical area are affected by the presence of pollutants, especially heavy metals. In this study 40 adult animals slaughtered in the abattoir in Barrancabermeja, from bovine holdings nearby industries with petroleum extraction activities were studied. The presence of lead, cadmium, molybdenum and zinc in liver, kidney, muscle and skin was determined by atomic absorption spectrophotometry and the results obtained with the limits set by the European Union and the Codex Alimentarius were compared [1,2]. Higher concentration of all metals was found in Barrancabermeja except Zn presented higher levels in Yondó. A significant number of liver samples (90 and 50%), kidney (75 and 15%) and muscle (85 and 90%) of both locations exceeded the permissible values of Pb both the Codex Alimentarius and the European Union. A similar situation occurs with cd in Barrancabermeja, exceeding 85%, 10% and all (100%) values allowed by the European Union in liver, kidney and muscle respectively, while in Yondó, 65% of samples liver and muscle samples exceed all those same limits. Therefore we can conclude that the consumption of meat and offal from cattle grazing in the Middle Magdalena Colombian, represents a serious risk to human health as a result of its high degree of contamination with heavy metals.

Key words: Bovine, grazing, heavy metals, petroleum industry, viscera.

Introducción

El término “metales pesados” ha sido utilizado en forma general para describir aquellos metales y semimetales con efectos potencialmente tóxicos para los seres vivos y para el medio ambiente. A pesar de que algunos de estos elementos son esenciales para determinadas funciones bioquímicas en animales y plantas pueden ocasionar importantes efectos perniciosos si se llegan a concentrar en el organismo [3,4].

La detección de metales tóxicos en los alimentos ha cobrado importancia debido a su toxicidad y a su capacidad de bioacumulación en el organismo. Su presencia en los productos de origen animal es el paso previo al consumo y depósito en el hombre, como último eslabón de la cadena alimenticia. En el caso de los rumiantes la entrada de estos metales pesados puede iniciarse con los pastos consumidos, y que en muchas ocasiones tienen su origen en la actividad industrial desarrollada en las áreas donde los animales son criados [4]. Se ha comprobado que elevadas concentraciones de metales pesados como cadmio y plomo disminuyen la productividad y los índices reproductivos, afectan al sistema inmune, incrementando la susceptibilidad a las enfermedades, además de ser responsables de alteraciones mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas [5]. Asímismo es pertinente resaltar el Zn como un mineral traza esencial por su rol estructural, catalítico y regulatorio de la actividad celular, al cual se debe la capacidad de aumentar la resistencia del organismo a intoxicaciones por metales tóxicos como mercurio (Hg), Plomo

(Pb) y cadmio (Cd), pues el Zn es un potente inductor de la síntesis de metalotioneína(MT), una proteína aniónica con alta capacidad quelante de los citados metales, y los síntomas clínicos por su deficiencia en bovinos se caracterizan por afecciones podales, lesiones en piel, menor ganancia de peso [6]. En lo referente al Molibdeno, catalizadores con molibdeno se utilizan en productos de petróleo para eliminar azufre, bajando al mínimo estas emisiones. Esto se aplica en diversos procesos en el área química, petroquímica y de otras industrias [7] [8]. Se ha registrado contaminación de los pastos de hatos bovinos localizados en inmediaciones de las refinerías de petróleo que emplean Molibdeno [9], en dichos hatos se presentaron brotes de diarreas persistentes en los bovinos adultos, acompañadas de adelgazamiento, pelo seco y brillante, el pelo negro adquiría tonos rojos o grises al despigmentarse, en los terneros se apreciaban además trastornos en la locomoción [9]; Auza (1983), citado por Brem et al [10], responsabilizó a la acción del molibdeno, de problemas reproductivos originados por desequilibrios de hormonas hipofisarias y ováricas en hembras bovinas.

Tanto a nivel nacional como internacional se han establecido una serie de normas con el fin de garantizar, en toda la cadena de producción, la inocuidad de los productos cárnicos y lácteos. Dentro de esta normativa cobra un papel destacado el control de los metales pesados en las producciones bovinas, con el fin de mitigar el impacto

*e-mail: jhonjabu@unipamplona.edu.co

ambiental e incentivar una producción más limpia, unas buenas prácticas ganaderas y la llamada "agricultura orgánica" o "agricultura limpia". Frente al pobre desarrollo de estas alternativas de producción, debe hacerse énfasis en la implementación de estudios científicos, como el presente, que puedan permitir el acceso de la población a una alimentación más sana [12,18].

La agroindustria cárnica representa el 2,3% de la producción bruta de la Industria manufacturera de Colombia y el 2,1% del valor agregado creado por la Industria Nacional y generan en forma directa casi 21.000 empleos [13]. Los municipios de Yondó y Barrancabermeja, son zonas de influencia de las explotaciones petrolíferas en cuyas áreas aledañas hay ganaderías vacunas, para cuyos productores ha sido una constante preocupación la observación clínica de animales que cursan con enflaquecimiento progresivo, diarreas profusas, baja eficiencia reproductiva, problemas de piel y nerviosos, así como muertes súbitas. Con este proyecto se busca darle una respuesta a esta problemática que no ha sido diagnosticada en forma satisfactoria y sobre todo tratar de encontrar la relación que hay entre dichas patologías con la cercanía de la industria petrolífera y por ende la liberación al medio ambiente por parte de estas industrias, de metales tóxicos.

Material y Métodos

El estudio se llevó a cabo en los municipios de Yondó y Barrancabermeja, localizados en la región del Magdalena Medio, Colombia (Figura 1). Esta región se destaca por la cría de ganado de manera extensiva y donde la mayoría de los hatos consumen exclusivamente de pastos naturales. Además es importante señalar que esta zona está acentuadamente influenciada por la industria petroquímica, tanto de extracción como de procesado.

El número de animales a muestrear fue tomado de acuerdo con la densidad poblacional bovina de la región. En Yondó se muestrearon 20 bovinos y otros tantos en Barrancabermeja (siguiendo la metodología empleada por Alcocer [11] y por Madero y Marrugo [14]). Siempre fueron bovinos adultos, de ambos sexos, de raza cebú y sus cruces, con pesos promedio superior a 380 kg (Figura 2). Los animales nacieron y fueron criados sobre pastos naturales, abrevados con aguas naturales y suplementados únicamente con bloques de sal marina. El muestreo tuvo una duración de doce meses.

Figura 1. Ubicación geográfica de la zona de estudio.

Sangre entera, hígado, riñón, músculo y piel fueron los órganos escogidos para el estudio. De cada animal fueron extraídos 20 ml de sangre entera mediante jeringas plásticas, proveniente del desangrado a nivel de vena yugular. La muestra de hígado (30 g) fue tomada del lóbulo cuadrado, para el riñón se muestreó del órgano derecho (mediante corte transversal involucrando corteza y médula), la muestra del músculo se tomó del músculo diafragmático, a nivel de los pilares del diafragma (aproximadamente10 cm^2), así como una porción de piel, de la región metacarpiana o metatarsiana de aproximadamente 10 x 2 cm, teniendo en cuanta que de cada muestra se tomaron 3 sub-muestras, de unos 10 g. Para el corte de cada una las piezas se utilizaron cuchillos de poliestireno descartables.

Las muestras fueron refrigeradas y enviadas inmediatamente al Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de Pamplona para el análisis de los metales pesados: cadmio (Cd), plomo (Pb), molibdeno (Mo) y zinc (Zn), por espectrofotometría de absorción atómica de llama en un espectrofotómetro Perkin Elmer AAnalyst 300. Se utilizó un diseño de bloques al azar para la selección de los bovinos y se empleó la prueba de Tukey para comparación de medias, intentando evaluar la posible diferencia entre las concentraciones de los metales entre las dos áreas de estudio. Todos los análisis estadísticos se desarrollaron en el programa SAS (Statistical Analisys System) versión 9.0 y la significación estadística se definió como $p<0.05$. Los resultados de expresan en mg/Kg.

Resultados

En general todos los metales estudiados presentaron valores más elevados en el municipio de Barrancabermeja que en Yondó. El Cd mostró mayores niveles, con carácter estadístico ($p<0.05$), en todos los muestras examinadas excepto en la sangre (Tabla 1). De la misma manera, las concentraciones de Pb en hígado, riñón y piel fueron mayores estadísticamente ($p<0.05$) en Barrancabermeja, aunque en sangre y músculo la concentración de este elemento no mostró diferencia estadística (Tabla 1). El molibdeno (Mo) presentó una concentración estadísticamente mayor en todos los órganos muestreados en Barrancabermeja (Tabla 1).

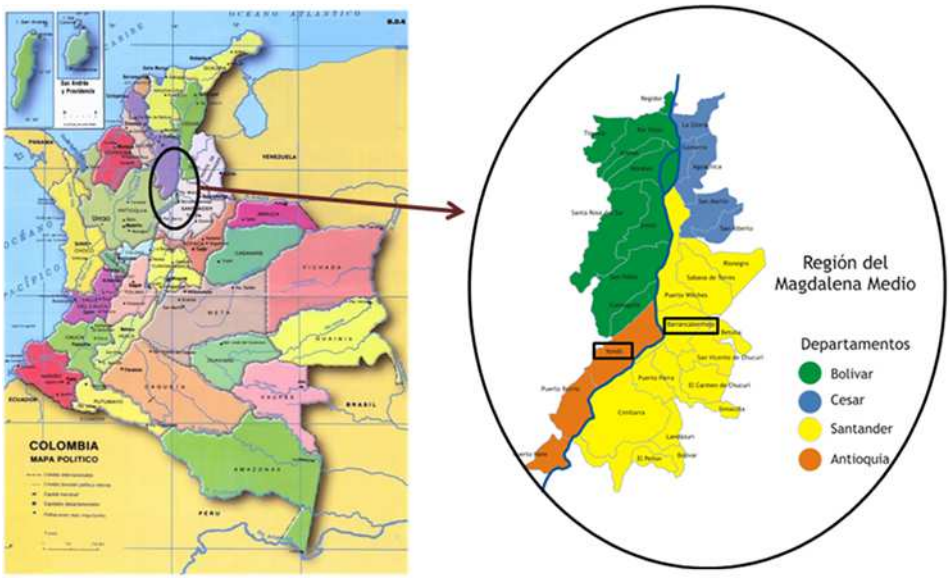


Figura 2. Ubicación geográfica de la zona de estudio.

El zinc (Zn) tuvo un comportamiento un tanto diferente. Si bien las mayores concentraciones en todos los órganos evaluados se presentaron en Yondó no hubo diferencia estadística ($p>0.05$) con relación con las muestras recogidas en Barrancabermeja (Tabla 1).

Al comparar los valores encontrados con los límites permisibles en las normas mencionadas (Codex Alimentarius y Unión Europea [1,2]) se observó que para el Pb el 50% de las muestras hepáticas, el 15% de las muestras renales y el 90% de musculares de los bovinos procedentes de Yondó superaron los valores indicados por la normativa anteriormente señalada. La cantidad de este metal no excedió estos límites en piel y sangre, cuando se compararon con ambas normas (Tabla 1).

Al analizar el Pb en el municipio de Barrancabermeja comprobamos que el 90% de las muestras de hígado, el 75% de las muestras de riñón, el 85% de las correspondientes a músculo y el 5% de piel exceden los límites permisibles por las dos normas señaladas (Tabla 1). Algo similar sucede con el Cd en el municipio de Barrancabermeja, así 85% de las muestras hepáticas, el 10% de las muestras renales y la totalidad (100%) de las musculares sobrepasan los valores señalados por la Unión Europea. En el municipio de Yondó el 65% de las muestras de hígado y todas las muestras de músculo superan los límites permisibles para este elemento en la

Norma de la Unión Europea (Tabla 1). Para el Mo, así como también para el Zn, no se han establecido niveles máximos permisibles en ninguna de las dos normas, por lo tanto no podemos contrastar los valores hallados en este estudio.

Tanto en los animales estudiados en Yondó como en los estudiados en Barrancabermeja los niveles de Zn en sangre se encuentran ligeramente por encima de los niveles sugeridos por Mc Dowell y Arthington [15], aunque en hígado y músculo los niveles de Zn son inferiores a los que indican estos autores tanto para humanos como para rumiantes.

Discusión

Las concentraciones de metales pesados en diferentes órganos bovinos han sido estudiadas en muchos países del mundo. En este sentido Vásquez-Moreno *et al* [16], revelaron elevados niveles en algunos metales pesados, señalando la acumulación de estos tóxicos en bovinos en el noreste de México y el riesgo que representa para el hombre el consumo de los productos derivados de estos animales. En Colombia, Madero y Marrugo evaluaron la presencia de metales Pb, Cu, Cd y Hg en hígado y músculo pectoral derecho de bovino, procedentes de fincas de la zona del Sinú y San Jorge. Observaron que los rangos de Hg, Cu, Cd y Pb estaban por debajo de los parámetros de referencia de la Comisión Europea y la Norma Oficial Mexicana, cosa que contrasta lo encontrado en el presente estudio, donde se observa claramente la influencia de la industria petrolera en la zona [14].

Los datos consignados en la tablas 1, sobre las concentraciones de Pb y Cd en hígado, riñón y músculo de bovino en las dos localidades estudiadas difieren de los obtenidos por diversos autores. Así en la mayoría de estudios realizados en distintas especies animales se han descrito niveles mucho más altos en hígado y riñón con respecto al músculo [5], mientras que en el presente trabajo la mayor concentración fue hallada en el músculo. Para la Unión Europea los niveles máximos permisibles de Pb y Cd en músculo de bovino son de 100 y 50 µg/kg, respectivamente, mientras que las concentraciones de esos metales medidas en el presente estudio superan claramente esos valores (Tabla 1).

En bovinos las concentraciones hepáticas de Pb también han sido evaluadas por otros investigadores. Así Iwegbue [17] registró cantidades entre 0.00 y 0.26 mg/kg; Miranda y colaboradores [18] indican cifras desde no detectables hasta 411 µg/kg para zonas industriales y no detectables a 174 µg/kg para zonas rurales, Blanco–Penedo [19] desde no detectables hasta 509 µg/kg. y Nwude [20] desde 0.09 hasta 7.32 mg/kg. En cambio las concentraciones hepáticas de Pb registradas en este estudio, y en las dos zonas, solo son superadas por Liu [21], con cifras mucho mayores (hasta 15.3 mg/kg).

Tabla 1. *Concentraciones de metales en las localidades de muestreo y valores de referencia. a, b. Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencia significativa ($p<0.05$).*

CADMIO (mg/Kg)					
ZONA	**Hígado**	**Riñón**	**Músculo**	**Piel**	**Sangre**
Barrancabermeja	0.63 ± 0.15[a]	0.80 ± 0.20[a]	0.41 ± 0.13[a]	0.28±0.13[a]	0.19 ± 0.07[a]
Yondó	0.52± 0.06[b]	0.55 ± 0.05[b]	0.20 ± 0.05[b]	0.28±0.14[a]	0.15 ± 0.04[b]
Codex Alimentarius	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
Unión Europea	0.5	1.0	0.05	n.r	n.r
PLOMO (mg/Kg)					
ZONA	**Hígado**	**Riñón**	**Músculo**	**Piel**	**Sangre**
Centro	0.62±0.09[a]	0.54±0.09[a]	0.24±0.12[a]	0.33±0.10[a]	0.12±0.02[a]
Yondó	0.49±0.08[b]	0.38±0.10[b]	0.22±0.08[a]	0.29±0.03[b]	0.12±0.03[a]
Codex Alimentarius	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5
Unión Europea	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5
MOLIBDENO (mg/Kg)					
ZONA	**Hígado**	**Riñón**	**Músculo**	**Piel**	**Sangre**
Centro	6.43±2.05[a]	5.59±2.04[a]	4.65±2.59[a]	4.12±2.53[a]	1.14±1.14[a]
Yondó	5.78±1.01[b]	5.01±1.17[b]	3.40±0.95[b]	2.27±0.84[b]	1.55±0.55[b]
Codex Alimentarius	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
Unión Europea	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
ZINC (mg/Kg)					
ZONA	**Hígado**	**Riñón**	**Músculo**	**Piel**	**Sangre**
Centro	17.4±8.66[a]	14.95±7.38[a]	14.5±8.78[a]	8.39±6.75[a]	3.19±1.93[a]
Yondó	33.83±6.61[b]	25.49±5.47[a]	21.27±5.85[a]	11.00±2.96[a]	4.71±1.40[a]
Codex Alimentarius	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
Unión Europea	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r

n r= no se reporta

Los niveles hepáticos de Cd reportados en otros estudios variaron entre 3.39 y 131 µg/kg para zonas industriales y 6.43–221 µg/kg para zonas rurales [18], desde no detectables a 85.5 µg/kg [19], desde 0.03 a 0.13 mg/kg [14] ,de 7.92 ± 2.36 mg/kg [21] y entre 0.001 y 0.02 mg/kg [20]. Estas concentraciones son más bajas que las reportadas en las áreas de este estudio (0.23 - 0.87 mg/Kg para Barrancabermeja y 0.41 - 0.61 mg/Kg para Yondó), siendo superadas por los valores encontrados por Liu [21].

Los niveles de Zn se encuentran, en términos generales, por debajo de lo establecido por ambas normas. Este hecho puede deberse al antagonismo existente entre este elemento y la alta concentración del cadmio presente en el organismo. Esta aseveración coincide con lo dicho por Villanueva [22] quienes aseveran que los requerimientos de Zn para los rumiantes varían de 30 a 80 mg/Kg y sugieren que 7 mg/Kg de Zn en la dieta son suficientes para mantener el crecimiento en becerros y corderos, pero requieren 15 mg/Kg para mantener niveles adecuados en sangre. Por otro lado Underwood y Suttle [6] concluyeron que un consumo de 17 mg/Kg es aparentemente adecuado para el crecimiento de corderos y becerros, pero inadecuado para un desarrollo y función testicular normal, lo que se mejoró significativamente por un consumo dietético de 32 mg/Kg [15]. De todas maneras, según el NRC [23], el máximo tolerable para bovinos es de 500 mg/Kg. Según Mc Dowell y Arthington [15] el contenido plasmático de Zn es el índice más ampliamente usado para evaluar el estado del Zn tanto en humanos como en animales. Para determinar deficiencias en rumiantes se considera que la medida de Zn en plasma (0.6 a 0.8 mg/Kg) y en forraje (<40 mg/Kg) sería una buena combinación para chequear el estado del Zn, lo que muestra que en el presente estudio se encontraron niveles ligeramente por debajo de este postulado.

Conclusiones

Entre los metales pesados estudiados vale la pena destacar la presencia del Pb y Cd los cuales se encuentran en altas

concentraciones en un buen número de muestras de hígado, riñón y músculo en ambos municipios. Los niveles hallados sobrepasan los límites permisibles establecidos en las normas del Codex alimentarius y de la Unión Europea.

En lo referente al Molibdeno, se encontraron niveles superiores y estadísticamente significativos en todos los órganos muestreados en Barrancabermeja, lo que coincide con la mayor casuística clínica en cuanto a incidencia de diarreas, problemas de piel y reproductivos en los bovinos de esta zona, que va en consonancia con lo citado por Radostits *et al* (2001), sin embargo, esta situación no es determinante para hacer la asociación causal directa, por lo que es necesario establecer la correlación de dichos hallazgos con los niveles de Molibdeno en suelo, forrajes y agua de los hatos en estudio. De igual manera, sería conveniente realizar otros estudios en similares condiciones y regiones del trópico para establecer unos límites permisibles de tanto de Mo como de Zn en carne de bovino.

Finalmente podemos concluir que el consumo de carne y vísceras de los bovinos que pastorean en las zonas del Magdalena Medio Colombiano pueden representar un grave riesgo para la salud humana por su alto grado de contaminación con metales pesados, y quizá ello pueda estar influenciado por la industria petroquímica, por lo que se precisan estudios adicionales.

Agradecimientos

La presente investigación se realizó bajo el auspicio del proyecto de investigación: "Determinación de residuos de metales pesados en el suelo, plantas, agua y tejidos de bovinos expuestos en áreas de alto grado de contaminación y detección de puntos críticos para su control", ejecutado por los grupos de investigación Agricultura y Ganadería Sostenibles (GIAS), Ciencias Animales (GICA), y el Recursos Naturales de la Universidad de Pamplona, cofinanciado por Colciencias, CÓDIGO PRE00503030302. Se agradece al Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira y al laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de Pamplona.

Bibliografía

1. Comisión Económica Europea. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. (Diario oficial de la Unión Europea). Págs. 19-20.
2. Codex Estándar 193-1995 (2010). Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. Adoptada en 1995. Revisada en1997, 2006, 2008, 2009. Enmendada en 2010. Pp: 1-43.
3. Soghoian S, Sinert R, Tarabar A (2011) Heavy Metal Toxicity. Staff Physician, Department of Emergency Medicine, State. University of New York Downstate Medical Center. American College of Emergency Physicians, and Society for Academic Emergency Medicine. 1-10.
4. González-Montaña JR (2009) Metales pesados en carne y leche y certificación para la Unión Europea. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 22 (3): 305 - 310.
5. Buck WB (2003). Toxicologia Veterinaria Clinica (Spanish Edition) (Spanish) Paperback – October, 2003. Publisher: Acribia, Zaragoza.
6. Underwood EJ, Suttle NF (1999) The Mineral Nutrition of Livestock" 3rd ed., Ed. CABI, Midlothian, UK. (18)
7. Torres L, Kharisov B y Elizondo N (2001). Recuperación de V y Mo de catalizadores gastados de la industria petroquímica. Ciencia UANL 4 (2): 198-204
8. González I, De Jesús J, Rivas G y Urbina C (2011) Estudio de sulfuros de molibdeno generados mediante la descomposición térmica de emulsiones agua/aceite. ACI; 2(1): 51-62
9. Radostits O (2001). Medicina veterinaria: tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino, Interamericana – McGrawhill. 1920 p
10. Brem, J, Mestre J, Pochon D y Trulls H (2001-2002). Alteraciones del ciclo estral provocadas por un alto ingreso de molibdeno en vaquillonas Brangus y respuesta a la suplementación con cobre. Rev Vet, 12/13: 1/2 ; 28-33.
11. Alcocer VM, Castellanos A, Herrera Francisco, Chel L, Betancur D (2007) Detección de metales pesados y dicloro difenil triclor etano en músculos y órganos de bovinos en Yucatan. Técnica Pecuaria en México. 45(2): 237-247. (6)
12. Pulido JI (2007) Guía para la implementación de las buenas prácticas ganaderas. Colombia: CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo. (7)
13. Departamento Nacional de Planeación (2007). Agenda Interna para la Competitividad. Agenda Interna para la Productividad y la Competitividad. Documento sectorial, Agroindustrial. Bogotá, 15-17. (8)
14. Madero A, Marrugo J (2011). Detección de metales pesados en bovinos, en los valles de los rios Sinú y San Jorge, departamento de Córdoba, Colombia. Rev MVZ Córdoba, 16(1): 2391-2401. (9)
15. McDowell LR, y Arthington JD. (2005). Minerales para Rumiantes en Pastoreo en Regiones Tropicales. Cuarta ed. IFAS University of Florida. (10)
16. Vásquez-Moreno L, Bermúdez M, García L, Languré A, Flores M, Orantes C (2002). Residuos tóxicos en tejidos animales destinados al consumo. Revista Científica, FCV-LUZ / 12 (3): 186-192 (11)
17. Iwegbue CMA (2008) Heavy metal composition of livers and kidneys of cattle from Southern Nigeria. Veterinarski Archiv. 78:401-410. (12)
18. Miranda M, Lopez-Alonso M, Castillo C, Hernandez J, Benedito JL (2005) Effects of moderate pollution on toxic and trace metal level in calves from a polluted area of Norther Spain. Environment International. 31: 543-548. (13)
19. Blanco-Penedo I, Cruz JM, Lopez-Alonso M, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. (2006) Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. Environment International. 32: 901-906. (14)
20. Nwude DO, Okoye PAC, Babayemi JO (2011) Assessment of heavy metal concentrations in the liver of cattle slaughter during three different seasons. Research Journal of Environmental Sciences. 5(3): 288-294. (15)
21. Liu ZP (2003) Lead poisoning combined cadmium in sheep and horses in the vicinity of non-ferrous metal smelters. Science of The Total Environment. 309:117-126. (16)
22. Villanueva G (2011). Nutrición del ganado: Zinc. Sitio Argentino de Producción Animal. p: 1-2. (17)
23. NRC, 2005. Mineral Tolerance of Animals: Second Revised Edition. Academy of Sciences-National Research Council, Washington, D.C. (19)

Rev. Toxicol (2015) 32: 131-134

Comparison of different cooking process for the emerging mycotoxins reduction in fresh pasta

García-Moraleja A., Font G., Mañes J., Ferrer E.*

Laboratory of Toxicology and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain.

Abstract: Mycotoxins are toxic metabolites from filamentous fungi like *Aspergillus spp., Penicillium spp.,* and *Fusarium spp*. There are emerging mycotoxins (enniatin A, A_1, B, B_1 and beauvericin) which have been discovered recently. The present study evaluates the emerging mycotoxins in fresh pasta and how different culinary treatments affect mycotoxins concentration. The analysis of 19 commercialized samples with an Ultra-Turrax extraction in acetonitrile:methanol and High Performance Liquid Chromatography tandem mass spectrometry of triple quadrupole (HPLC-MS/MS-QqQ) detection. Results show that the 84% of samples were contaminated with at least one analyzed mycotoxin. The most abundant mycotoxins were ENB and ENB_1 with main concentration of 7.03 and 4.43 µg/kg respectively. The study of culinarian treatments shows that pH affects mycotoxins detoxification. Acid pH was the most effective detoxificant process, with depletions from 60% of BEA to 98% of ENA. ENA was the most sensible mycotoxin in most treatments. Easy modification of the traditional cooking process, as adding lemon juice on the boiling water, could improve food safety and decrease human exposition to mycotoxins.

Keywords: Fresh pasta, emerging mycotoxins, cocking process.

Resumen: Comparación del efecto de diferentes tipos de cocción de la pasta fresca en el contenido de micotoxinas emergentes. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos del género *Aspergillus spp., Penicillium spp.,* y *Fusarium spp.* Las micotoxinas emergentes (Eniatina A, A_1, B, B_1 y beuvericina) han sido descubiertas recientemente. En el presente estudio se analiza la contaminación de las citadas micotoxinas en pasta fresca comercializada en supermercados de la ciudad de Valencia (España), y a continuación la evaluación de la descontaminación tras la cocción de la pasta bajo diferentes condiciones de pH y tiempo. Al análisis de un total de 19 muestras se procede con extracción con Untra-Turrax (acetonitrilo:agua), y posterior detección mediante cromatografía liquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas en tándem con triple cuádruplo (HPLC-MS/MS-QqQ). Los resultados mostraros que el 84% de las muestras analizadas presentaron contaminación por al menos una de las micotoxinas estudiadas. Las micotoxinas más abundantes fueron ENB y ENB_1 con concentraciones medias de 7.03 y 4.43µg/kg respectivamente. El estudio de los tratamientos culinarios mostro que el pH afectaba a la concentración de micotoxinas. El pH ácido mostro la mayor capacidad para la degradación de micotoxinas con reducciones del 60% de Beauvericina al 98% de ENA. La ENA fue la micotoxina estudiada más sensible al efecto de los tratamientos. Modificaciones sencillas en el tipo de preparación de alimentos en los hogares, como por ejemplo la adición de zumo de limón al agua de cocción, podría mejorar la seguridad alimentaria disminuyendo así la exposición a micotoxinas en la ingesta.

Palabras clave: Pasta fresca, micotoxinas emergentes, tratamientos culinarios.

Introduction

Mycotoxins are toxic metabolites from filamentous fungi like *Aspergillus spp., Penicillium spp., and Fusarium spp.* and they commonly enter into the food chain through contaminated food [1]. FAO consider that about 25% of food plants contain several amounts of mycotoxins [2]. Fungi mainly grow in wheat, barley and maize during the harvest [3], but food products can be also infected by fungi species. Therefore, mycotoxin contamination of food products can be indirect (by ingredients during harvesting) [4], or direct (when the food product becomes infected) [5]. Nowadays are known about 400 mycotoxins, but there are other fungi secondary metabolites which are potentially toxic and whose toxicity or effects in humans have not been evaluated yet [6]. There are emerging mycotoxins which are named like that because they have been discovered recently. In consequence, EFSA has not suggested maximum limits in food products for them. Emerging mycotoxins are enniatins (ENS): enniatin A (ENA), enniatin A_1 (ENA_1), enniatin B (ENB), enniatin B_1 (ENB_1), and beauvericina (BEA). Their structure is shown in Figure 1. They are cyclic depsipeptides, commonly composed of three D-a-hydroxyisovaleric acid (Hiv) residues linked alternatively to three L-configured N-methil. To date are described as molecules with antibiotics and insecticide effects. BEA consists on a d-α-hidroxiisovalina alternated with N-metilfenilalanina. Toxicity has been demonstrated in different human cellular lines. It can induce

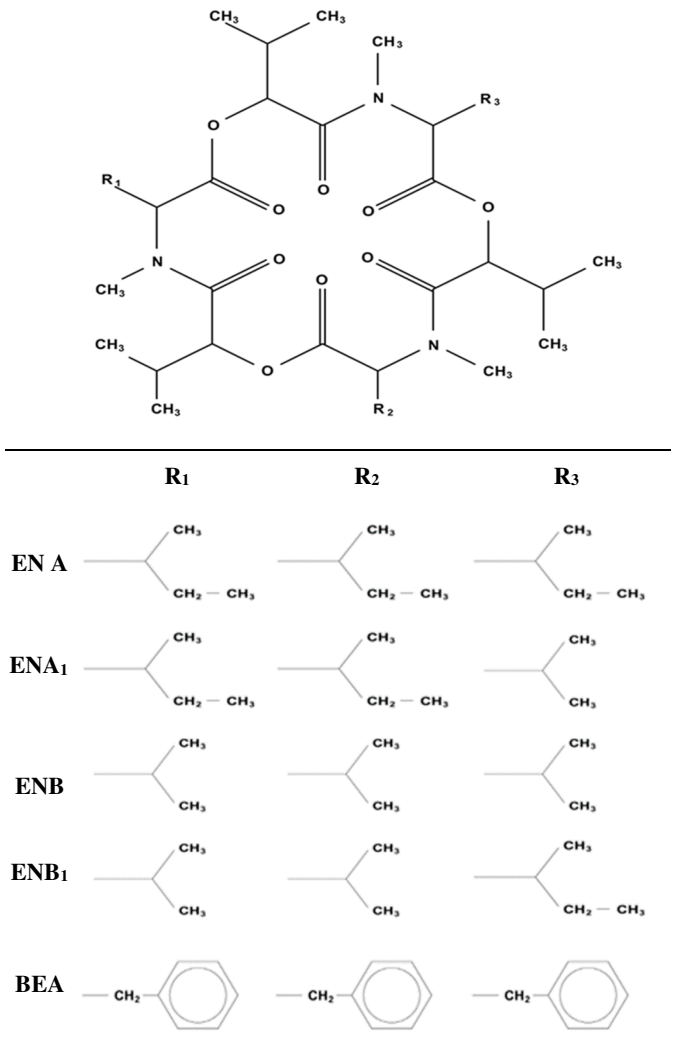


Figure 1. Chemical structures of enniatins (ENs) and beauvericin (BEA).

*e-mail: ana.garcia-moraleja@uv.es

apoptosis and DNA fragmentation. Furthermore, BEA could be a specific cholesterol acyltransferase inhibitor [7]. The five molecules have a similar structure to each other [2], all of them are cyclic hexadepsipeptides, and the amino acid residues are aromatic N-methyl-phenylalanines and aliphatic N-methyl-valine or–isoleucine. The amino acids are linked by peptide bond, and there are intramolecular ester bonds. There is a high concentration of negative ions inside of the molecules which makes that the molecules can form metallic bonds [8], and because of the lipophilic properties they can also get into cellular membrane and make channels for K^+, Na^+, Mg^{++}, and Ca^{++}, breaking down the homeostasis of cell like it was said before [9].

ENS and BEA levels vary greatly between different climates and plants. There are even differences among specimens of the same harvest [10,11]. It has been detected DON, OTA, and AFB1 in pasta samples, and Serrano et al. [12] found emerging mycotoxins in pasta products collected in Spain. Different authors study emerging mycotoxins in similar food matrix, for example Oueslati [7] detected emerging mycotoxins in cereals

from Tunisia by LC-DAD, and Vaclavikova [13] found ENS and BEA in cereals by LC-MS.

In many occasions, the intake of food occurs after a culinary process. This culinary treatment could affect emerging mycotoxins levels because of their peptidic structure. Therefore, it is essential to evaluate how culinary treatments affect mycotoxins in order to estimate the intake of population and the health risk. Most mycotoxins are thermo resistance in the range of home treatments temperatures (80-120ºC) [14], but some studies show that emerging mycotoxins can be removed. Vaclavikova et al., [13] detected a decrease of ENS by baking bread, and Serrano et al., [12] detected a 78% of degradation of ENS proportionally to the time of heat treatment. Furthermore, other authors propose that the detoxification depends largely on the pH of the aqueous medium process. For example, the alkaline medium produce a reduction of aflatoxins of the 92% [15], or a reduction of AFB_1 of the 92% with acid medium treatment (pH 3, 7 by citric acid) [16]. Other mycotoxins like OTA are stable under high temperatures, but after boiling those with water Sakuma et al [17] detected a significant decrease of OTA because it leaves the matrix. Maybe this also occurs with emerging mycotoxins.

In this context, the present study raises the following objectives: evaluation of emerging mycotoxins (EN A, EN A_1, EN B, EN B_1 and BEA) in fresh pasta from supermarkets in Valencia, Spain, by extraction with Ultra Turrax and determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) with triple quadrupole (QqQ). Evaluation of how different culinary treats affect mycotoxins concentration, undergoing fresh pasta to different cooking times and pH.

Material and methods

Sampling

Sampling was conducted on supermarkets in Valencia, Spain. Fresh pasta samples were selected among commercial brands with similar ingredients, like wheat grits and egg. A total of 19 samples were purchased following the legal requirements of the regulation:

commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 [18], laying down the methods of sampling and analysis for the official control of levels of mycotoxins in foodstuffs. In point B of this rule it is explained the method of sampling for cereals and cereal products for the official control of the maximum levels established for aflatoxin B_1, total aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium-toxins in cereals and cereal products.

Culinary process

A total of 6 different culinary processes were applied to a sample mycotoxin free. This sample (PF 19) was spiked with 150µg/g of each studied mycotoxin. In all treatments were used 8 parts of water per part of pasta like manufacturer advise (1:8 pasta:water). The temperature of cooking was always constant, keeping the boiling point. There were two cooking times, 4 and 8 minutes, and different cooking pHs (≤3, 7, ≥9) were also tested. Thereby, from sample PF 19 were taken 6 added aliquots which were undergone like that: 2 aliquots were cooked with acid pH ≤3 (by adding citric acid to the boiling water), 2 with alkaline pH ≥9 (by adding calcic carbonate to the boiling water), and the 2 last samples with neutral pH. Each pH was cooked 4 minutes like the manufacturer advices, and 8 minutes like it is estimated that users do at home. In order to achieve acid pH it was added lemon juice to the cooking water, this addiction was made drop by drop in continuous stirring with a magnetic stirrer, and it was controlled by pH meter; for basic pH it was used the same procedure but it was added calcium carbonate.

Extraction procedure

Samples were crushed to a paste; 5g of the paste were extracted with 50ml of mixture Acetonitrile:H_2O (80:20) for 3 min by an Ultra-turrax (Ika T18 basic, Staufen, Germany). After, the extract was centrifuged (15 min, 5ºC, 4500rpm). The supernatant was decanted and evaporated to dryness with a Büchi Rotavapor R-200 (Postfach, Switzerland). The extract was dissolved with 5ml of AcN, and re-evaporated to dryness with nitrogen (N_2) at 35ºC using a Turbovap LV Evaporator (Zymark, Hoptikinton, USA). The extract was reconstituted with 1 ml of AcN/MeOH mix (50/50 v/v), and filtered with 13mm/0.22 µm nylon filter (Membrane Solutions, Texas, USA) before the injection in LC-MS/MS (QqQ).

LC-MS/MS Analysis

A Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer from Micromass (Manchester, UK), equipped with an LC Alliance 2695 system (Waters, Milford, MA) consisting on an autosampler, a quaternary pump, a pneumatically assisted electrospray probe, a Z-spray interface and Mass Lynx NT software Version 4.1, was used for the MS/MS analyses. The separation was achieved by a Gemini-NX C^{18} (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm particle size) analytical column supplied by Phenomenex (Barcelona, Spain), preceded by a guard column C^{18} (4 mm x 2 mm I.D.), using a gradient that started at 100% A (AcN) and 0% B (20 mM ammonium formate in methanol), total chromatogram 25 min. The electrospray ionization source values were as follows: capillary voltage, 3.50 kV; extractor, 5 V; RF lens 0,5 V; source temperature, 100 ºC; desolvation temperature, 300 ºC; desolvation gas (nitrogen 99.99% purity) flow, 800 L/h; cone gas 50 L/h (nitrogen 99.99% purity). Ideal fragmentation conditions were accomplished varying the cone voltage and collision energies for each compound. The cone voltage and the collision energy selected are shown in Table 1. The analyzer settings were as follows: resolution 12.0 (unit resolution) for the first and third quadrupoles; ion energy, 0.5; entrance and exit energies, -3 and 1; multiplier, 650; collision gas (argon 99.995% purity) pressure, 3.83 x 10-3 mbar; interchanel delay, 0.02 s; total scan time, 1.0 s; dwell time 0.1 ms. The mass spectrometer was operated in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode

Table 1: *LC-MS/MS (QqQ) optimized parameters.*

	Cone (V)	Collision energy (eV)		Precursor ion (m/z)		Product ion	
		Q^a	Q^b			Q	q
ENA	25	25	25	682	$[M+H]^+$	210	228
ENA_1	35	35	35	668	$[M+H]^+$	210	228
ENB	35	35	35	640	$[M+H]^+$	196	214
ENB_1	13	13	12	654	$[M+H]^+$	196	214
BEA	30	30	20	785	$[M+H]^+$	244	262

[a]*Q:* Quantification ion
[b]*q:* Confirmation ion

according with the European Union criteria [18], which establishes that a substance can be identified using LC-MS/MS in MRM mode by at least two transitions.

Results and discussion

Method Validation and analytical parameters

The analytical method was validated for fresh pasta samples (Table 2). Figure 2 shows a chromatogram of a spiked sample with the optimized conditions. Matrix effects were corrected by matrix-assisted calibration curves with a mycotoxins-free sample. For the evaluation of the linearity, calibration curves were constructed at six concentration levels: 0.025-25 µg/kg for the 5 mycotoxins. The results showed good correlation coefficients ($R^2 > 0.9965$). Limits of detection (LODs) were calculated using a signal-to-noise ratio of 3 (from 0.05 to 0.10 µg/kg). Limits of quantification (LOQs) were calculated using a signal-to-noise ratio of 10 (from 0.16 to 0.30 µg/kg). The accuracy was evaluated through recovery studies at two concentration levels (LOQ and 100 x LOQ). Intra-day precision was assessed by three determinations at each addition level in the same day, while inter-day precision was assessed by one determination at each addition level during three days. Recovery values for the low spiked level (LOQ) and the high spiked level (100 x LOQ) ranged from 85 to 110% and from 86 to 112%, respectively. Therefore, the results were in accordance to the limits set in European Commission [18]: a mean recovery (n=3) between 70% and 120%, and a RSD lower than 20%.

Table 2: *Analytical parameters of the validated method*

	SS [a]	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Linearity (R^2)	Recovery	
					intra-day (n =6)	inter-day (n = 6)
ENA	40	0.15	0.50	0.999	91 ± 4	90 ± 6
ENA_1	43	0.08	0.25	0.997	86 ± 9	88 ± 8
ENB	33	0.15	0.50	0.999	109 ± 9	112 ± 5
ENB_1	40	0.02	0.50	0.998	97 ± 11	95 ± 15
BEA	46	0.03	0.10	0.998	94 ± 4	94 ± 5

[a]SS: Suppression of Signal (Matrix Effect) = (slope matrix-matched/slope standard in solvent)*100

Natural occurrence of BEA y ENS

A total of 19 different samples of fresh pasta were evaluated. The results of the natural occurrence are shown in table 3. The 84% of the total of samples were contaminated with one or more studied mycotoxins. Talking about the co-occurrence of ENS, half of the total samples were positive for the four mycotoxins simultaneously (ENA, ENA_1, ENB, ENB_1), while only in the 12% of the samples were detected the five evaluated mycotoxins (ENA, ENA_1, ENB, ENB_1 and BEA) in agreement with Serrano et al., [19] that found similar percentages of occurrence in 114 pasta samples. On an overall assessment, the results showed that the most abundant mycotoxins were ENB and ENB_1 (main concentration 7.03 and 4.43 µg/kg respectively) in accordance with Juan et al., [20] that found ENB as the most concentrated enniatin in multicereal baby food and pasta. Nevertheless, rang of concentrations from Juan et al [20] (1100 and 106 µg/kg) were not suitable with the results of the present study (0.08 and 33.13 µg/kg). Concentrations of ENA and ENA_1 were 1.61 and 3.30 µg/kg respectively with occurrences of 63% and 53%, in disagree with Oueslati et al., [7] that found ENA and ENA1 the most concentrated mycotoxins in wheat products. BEA was the less abundant mycotoxin in concentrations ranging from 0.06 to 2.36 µg/kg.

Reduction of ENS and BEA in spiked samples

Degradation of mycotoxins in pasta after different heat treatments (different times and different pH) are shown in Figure 3. According to

Table 3: *Occurrence, main concentration and range of emerging mycotoxins in 19 commercial samples.*

	OCCURENCE[a] (%)	Mean[b] (µg/kg)	RANGE	
			MAX	MIN
BEA	21%	0.64	2.36±0.03	0.06±0.02
ENA	63%	1.61	5.09±0.04	0.07±0.01
ENA1	53%	3.30	9.28±0.03	0.11±0.03
ENB	84%	7.03	33.13±0.07	0.08±0.05
ENB1	63%	4.43	13.41±0.05	0.15±0.01

[a]Occurrence of mycotoxins in the total analyzed samples.
[b]Mean concentration in positive samples.

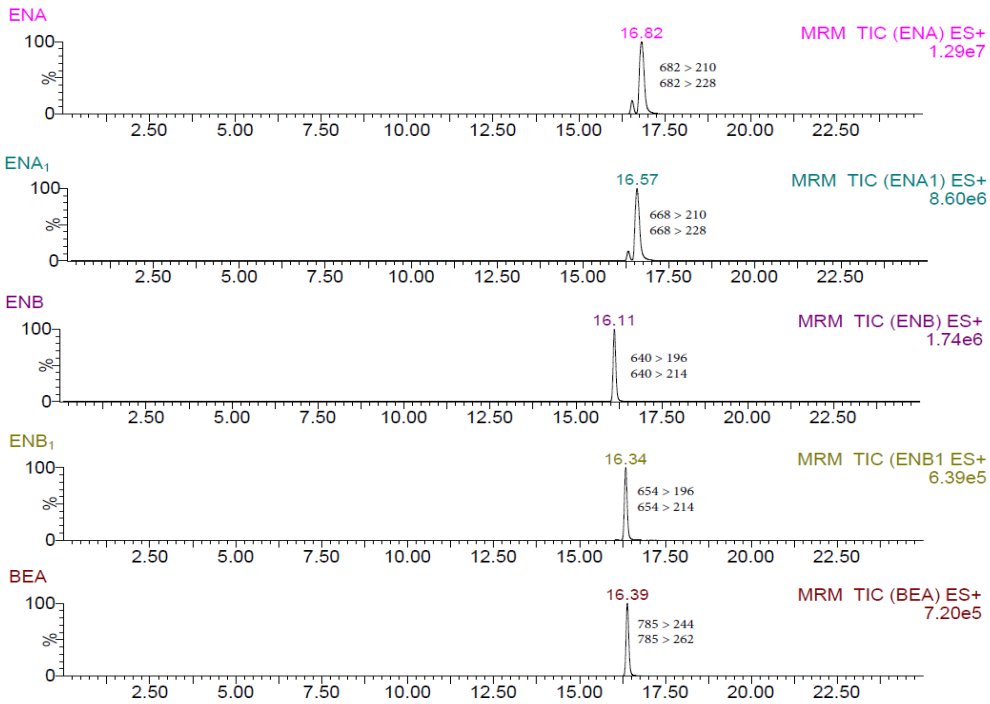


Figure 2: Chromatogram of a spiked sample of each mycotoxin (ENA, ENA1, ENB, ENB1 and BEA)

other authors [16], pH affects mycotoxins removal. The most significant decrease was with acid heat treatment (from 60% of BEA to 98% of ENA). It was tested that the organoleptic properties were not modify. ENA was the most sensible mycotoxin; it was hardly removed in all treatments (≥95%). The rest of mycotoxins showed percentages of degradation in all treatments but not as high as ENA. ENB presents degradations ranging from 45% to 69% (with alkaline 4 minutes treatment); BEA from 24% to 67% (alkaline pH); ENB1 from 17% to 67% (Acid pH), and the most resistant mycotoxin was ENA_1 ranging from 3% of degradation (neutral pH) to 64% (acid pH). Mendez-Albores et al., [16] detected a degradation of aflatoxis significantly affected by acid medium in sorghum. Cano-Sancho et al., [21] detected the loose of DON during the boiling of pasta, and Brera et al., [22] showed a significant reduction of DON (78%) after cooking pasta.

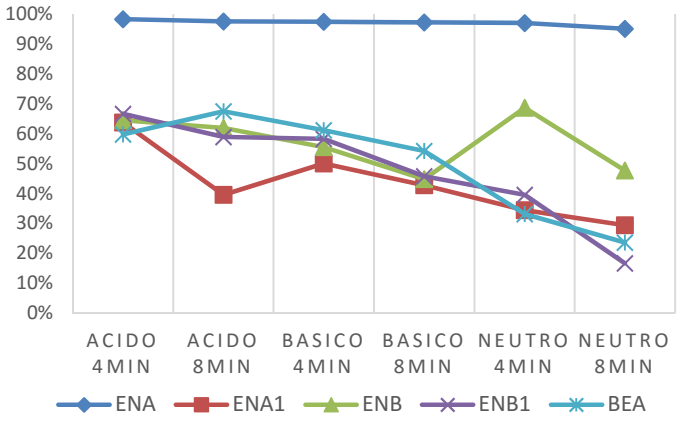


Figure 3: graphic representation of degradation percentage of each mycotoxin at different treatments conditions.

Conclusions

The analysis of emerging mycotoxins in real samples of fresh pasta collected in Valencia (Spain) has been performed. The results show that fresh pasta present contamination levels in order of µg/Kg. After the culinarian process, mycotoxins concentration was lower in acid cooking, and then cooking process at acid pH performed the higher decontamination in fresh pasta samples. Easy modification of the traditional cooking process, as adding lemon juice on the boiling water, could improve food safety and decrease human exposition to mycotoxins.

References

1. E.F.S.A. European Food Safety Autority (2015) EFSA Website (http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins).Accessed September2015.
2. Keoppen R, Koch M, Siegel D, Merkel S, Maul R, Nehls I (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations RID D-2752-2009. Applied Microbiology and Biotechnology, 86, 1595e1612.
3. Kokkonen MK, Jestoi MN (2009) A multi-compound LC-MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains. Food Analytical Methods, 2(2), 128–140.
4. Kandhai MC, Booij CJH, Van Der Fels-Klerx HJ (2011) Expert Study to Select Indicators of the Occurrence of Emerging Mycotoxin Hazards. Risk assessment, 31, 1, 160-170.
5. Edite Bezerra da Rocha M, Freire FDCO, Erlan Feitosa Maia F, Izabel Florindo Guedes M, Rondina D (2014) Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control 36(1), 159–165.
6. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R (2010) Application of an LC–MS/MS based multimycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins
7. Oueslati S, Meca G, Mliki A, Ghorbel A, Mañes J (2011) Determination of Fusarium mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. Food Control 22, 1373-1377.
8. Jestoi M (2008) Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin - A review. Crit Rev Food Sci Nutri; 48(1): 21-49.
9. Meca G, Mañes J, Font G, & Ruiz MJ (2011) Study of the potential toxicity of commercial crispy breads by evaluation of bioaccessibility and bioavailability of minor Fusarium mycotoxins. Food Chem Toxicol. 50(2):288-94.
10. Sifou A, Meca G, Serrano AB, Mahnine N, El Abidi A, Mañes J, El Azzouzi M, Zinedine A (2011) First report on the presence of emerging Fusarium mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in rice on the Moroccan retail markets. Food Control, 22, 12, 1826-1830.
11. Raiola A, Meca G, Mañes J, Ritieni A (2012) Bioaccessibility of Deoxynivalenol and its natural co-occurrence with Ochratoxin A and Aflatoxin B1 in Italian commercial pasta. Food and Chemical Toxicology 50, 280–287
12. Serrano A, Font G, Mañes J, Ferrer E (2013) Emerging Fusarium mycotoxins in organic and conventional pasta collected in Spain. Food and Chemical Toxicology, 51, 259–266.
13. Vaclavikova M, Malachova A, Veprikova Z, Dzuman Z, Zachariasova M, Hajslova J (2013) Emerging mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. Food Chemistry 136, 750–757.
14. Var I, Kabak B, Erginkaya Z (2008) Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. Food Control 19, 592–598.
15. Méndez-Albores JA, Arámbula VG, Vázquez BMB, Mendoza EM, Preciado ORE, Moreno-Martínez E (2003) Effect of High Moisture Maize Storage on Tortilla Quality. Journal of food science vol. 68, 5, 1878-1881.
16. Méndez-Alboresa A, Veles-Medina J, Urbina-Álvarez E, Martínez-Bustos F, Moreno-Martínez E (2009) Effect of citric acid on aflatoxin degradation and on functional and textural properties of extruded sorghum. Animal Feed Science and Technology 150, 316–329.
17. Sakuma H, Watanabe Y, Furusawa H, Yoshinari T, Akashi H, Kawakami H, Saito S, Sugita-Konishi Y (2013) Estimated Dietary Exposure to Mycotoxins after Taking into Account the Cooking of Staple Foods in Japan. Toxins 2013, 5(5), 1032-1042; doi:10.3390/toxins5051032.
18. European Commission (2002) Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities L 221/8, 17.8.2002.
19. Serrano AB, Font G, Ruiz MJ, Ferrer E (2012) Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. Food Chemistry 135, 423–429.
20. Juan C, Mañes J, Raiola A, Ritieni A (2013) Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Food Chemistry 140, 755–762.
21. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R, Aplication of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. Food Chemistry, 119(1), 408–416. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.042.
22. Cano-Sancho G, Sanchis V, Ramos AJ, Marín S (2013) Effect of food processing on exposure assessment studies with mycotoxins. Food Additives & Contaminants Part A, Vol. 30, No. 5, 867–875.
23. Brera C, Peduto A, Debegnach F, Pannunzi E, Prantera E, Gregori W, De Giacomo M, De Santis B (2013) Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. Food Control 32, 309-312.

Rev. Toxicol (2015) 32: 135-139

Mediation of a glutamate antagonist, a NOS inhibitor and antioxidants with –SH groups on striatal dopamine release induced by clothianidin

Alfonso M., Faro L.R.F., Oliveira I.M., Duran R.*

Department of Functional Biology and Health Sciences, University of Vigo, Spain

Abstract. Is Clothianidin is a neonicotinoid insecticide with selective action on nicotinic acetylcholine receptors. The aim of this study was to determine if the administration of a glutamate antagonist (APV), a NOS inhibitor (L-NAME) or two antioxidants (glutathione, and dithiothreitol,) prevent the increase in the striatal dopamine levels induced by clothianidin, using the microdialysis technique in freely moving and conscious rats. Intrastriatal administration of clothianidin (3.5 mM) produced an increase in striatal dopamine levels of 2462 ± 627%, with respect to basal levels. Coadministration of 0.65 mM APV and 3.5 mM clothianidin generated an increase in extracellular dopamine levels of 1089 ± 243.5%, being this increase 55.7% lower than the generated by clothianidin alone. Coadministration of 0.1 mM L-NAME and 3.5 mM clothianidin generated a significant increase in extracellular dopamine levels of 836.5 ± 150.6%., this increase is 70% lower than the generated by clothianidin alone. Coadministration of 3.5 mM clothianidin in combination with 0.4 mM glutathione induced an increase in striatal dopamine levels of 465.6 ± 126.8% , indicating that the administration of glutathione results in an inhibition of 81% of the effect generated by the infusion of clothianidin alone. Administration of 3.5 mM clothianidin associated with 0.005 mM dithiothreitol induced an increase in extracellular dopamine levels in the striatum of 693.8 ± 117.8% with respect to basal levels, being this increase 72% lower that the generated by clothianidin alone. Our results suggest that the effect of clothianidin on striatal dopamine release can be reduced by the administration of a glutamate antagonist, a NOS inhibitor or antioxidants with –SH groups, which suppose a simple protection mechanism against the damage caused for clothianidin.

Key words: Clothianidin, striatal dopamine, APV, L-NAME, antioxidants, microdialysis.

Resumen: La clotianidina es un insecticida neonicotinoide con actividad selectiva sobre los receptores de acetilcolina. El objetivo de este estudio es comprobar si un inhibidor de los receptores glutamatérgicvos (APV), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NAME) y dos antioxidantes como el glutatión y el dithiotreitol previene la liberación de dopamina inducida por la clotianidina, usando la técnica de microdiálisis en ratas conscientes y en libre movimiento. La administración intraestriatal de clothianidina (3.5 mM) produce un aumento de 2462 ± 627%, de los niveles estriatales de dopamina respecto a los niveles basales. La coadministracion de 0.65 mM de APV y 3.5 mM d clothianidina genera un a aumento de 1089 ± 243.5% de los niveles estriatales de dopamina, siendo este incremento 55.7% más bajo que el generado por la clotianidina sola. La Coadministration de.0,1 mM de L-NAME y3.5 mM de clotianidina genera un aumento de 836.5 ± 150.6% de los niveles extracelulares de dopamina, siendo este aumento un 55.7% más bajo que el generado por la clotianidina sola. La coadministracion of 3.5 mM clothianidina en combinación con 0.4 mM de glutatión induce un aumento de 465.6 ± 126.8% de los niveles estriatales de dopamina, indicando que la administración de glutatión provoca una inhibición del 81% del efecto generado por la infusión de clotianidina sola. La administración de 3.5 mM de clothianidina junto con 0.005 mM de diithiothreitol induce un aumento de 693.8 ± 117.8% en los niveles extracelulares de dopamina en el estriado, siendo este incremento 72% más bajo que el generado por la clotianidina sola. Nuestros resultados sugieren que el efecto de la clotianidina sobre la liberación estriatal de dopamina pueden ser reducidos por la administración de un antagonista glutamatérgico, un ihibibidor de la NOS o por antioxidantes con grupo –SH, lo cual supone un simple mecanismo de protección contra el daño causado por la clotianidina.

*e-mail: pallares@uvigo.es

Introduction

The neonicotinoid insecticide clothianidin is a broad spectrum pesticide, with selective action on nicotinic receptors of insects but with low toxicity in mammals [1]. Clothianidin is a metabolite of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam [2], but it is also commercialized as an insecticide. Exposure to clothianidin and other neonicotinoids produced neurological and behavioural changes in mammals. Several authors [3-5] have observed changes in motor activity, discoordination of walking, ataxia, tremors, etc. These alterations are probably related to an action of neonicotinoids or their metabolites on the cholinergic receptors present in different brain regions that control motor activity in animals, such as the striatum. Striatal dopamine is a neurotransmitter that coordinates motor activity in mammals.

In previous studies of our laboratory, we found that clothianidin induced an increase in striatal dopamine levels [6]. This dopamine release was caused by an exocytotic, vesicular, and calcium- and depolarization-dependent mechanism [7]. Furthermore, dopamine release induced by clothianidin was mediated by activation of nicotinic cholinergic receptors [6].

Glutamate is one of the neurotransmitters involved in striatal dopamine release. On the other hand, the activation of NMDA glutamatergic receptors induces a rise in the intracellular Ca^{2+} concentration. This Ca^{2+} binds to calmodulin and the Ca^{2+} / calmodulin complex activates the nitric oxide synthase (NOS) and produces nitric oxide. The use of glutamate antagonists or NOS inhibitors could prevent the effect of clothianidin on the dopamine release.

Also, other authors have studied the beneficial effect of some antioxidants (such as glutathione, GSH) on the toxic effects of various pesticides. GSH is the major low molecular weight thiol present in the mammalian organism and plays a fundamental role in cellular resistance against oxidative damage [8-9]. At present, the glutathione is the most studied antioxidant [9-10], being one of its main roles the storage and transport of cysteine. Glutathione acts detoxifying *reactive oxygen species* (ROS) and recycling thiols of oxidized proteins [11].. Another molecule that acts as a reducing agent and as a cellular antioxidant is dithiothreitol (DTT) [12-13]. DTT acts reducing the disulfide groups S-S to sulfhydryl groups -SH [12]. The preservation of sulfhydryl groups of a protein in a reduced status is critical for maintaining the function of many proteins, being DTT one of the exogenous thiols most commonly used for this purpose [14].

The aim of this work is to study if the administration of glutamate antagonist (DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid, APV), NOS inhibitor (L-nitro-arginine methyl esther, L-NAME) or antioxidants (GSH and DTT) prevent the increased levels of striatal dopamine induced by clothianidin administration in conscious and freely moving rats, using the microdialysis technique.

Material and methods

Female adult Sprague–Dawley rats (240 260 g) were used in all the experiments. Animals were housed under controlled conditions of temperature (22±2 °C) and ilumination (light:dark 14:10 h), with

free access to food and water. The experiments were performed according with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/CEE) and the Spanish Government (R. D. 53/2013) for the use of laboratory animals.

Clothianidin [(E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine], 99,9%, was purchased by Pestanal® (Sigma-Aldrich, USA). DL-2-amino-5- phosphonovaleric acid (APV), L-nitro-arginine methyl esther (L-NAME), glutathione (GSH), and dithiothreitol (DTT) were purchased by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Animals were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus (Narishige SR-6). The skin above the skull was cut, the top of the skull was exposed, and a small hole was drilled at the following coordinates from Bregma according to the atlas of Paxinos and Watson A/P +1.0 mm, L, +3.0 mm, V, +3.0 mm. A CMA12 guide cannula (CMA/Microdialysis, Sweden) was implanted through the skull just over the striatum. The cannula was anchored to the skull using steel screws and acrylic cement. Then, the rats were housed in individual cages. After microdialysis experiments, rats were sacrificed by cervical dislocation and brains were removed for subsequent histological confirmation of probe placement.

The experiments were carried out 24 h after implantation of the guide-cannula. Continuous perfusion was performed with a Ringer solution (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 3.4 mM $CaCl_2$; pH 7.4) using a CMA/102 infusion pump (CMA/Microdialysis, Sweden) at a flow rate of 1.5 µl/min. All experiments were conducted in awake, conscious, and freely moving animals. The experiments were carried out over periods of 3 or 4 h, and samples were collected every 20 min (30 µl). After three basal samples collected (60 min), clothianidin (3.5 mM) was infused for 60 min. After this, the medium was switched back to the unmodified Ringer solution and sampling was continued for an additional period of 60 min. In the groups pretreated with APV (0.65 mM), L-NAME (0.1 mM), GSH (0.4 mM), or DTT (0.005 mM), three basal samples were collected and after, the drug was infused for 60 min. Then, clothianidine together with the drug was infused during 60 min more. Finally, the medium was switched back to the unmodified Ringer solution and sampling was continued for an additional period of 60 min.

The samples obtained from the microdialysis procedure (30 µl) were collected by means of a CMA/142 microsampler (CMA/Microdialysis, Sweden) and dopamine levels were quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with electrochemical detection {15]. For this purpose, we used a Jasco PU-980 pump. The dialysates were injected (20 µl) using a Rheodyne 7125 injection valve. The isocratic separation of dopamine was achieved using Spherisorb ODS-1 reversed phase columns (5 µm particle size). The eluent (pH 4.0) was prepared as follows: 100 mM KH_2PO_4, 1 mM octanesulfonic acid, 1 mM EDTA, and 10 % methanol. Elution was carried out at a flow rate of 1.5 ml/min. The dopamine detection was achieved using an ESA Coulochem 5011A electrochemical detector at a potential of +400 mV.

Before probe implantation into the brain, the recovery of dopamine through the dialysis membrane was determined *in vitro*. The dialysis probes were placed in a standard solution of dopamine (50 pg/µL) and were flushed with Ringer solution at a flow of 1.5 µL/min for 20 minutes. Then, the levels of dopamine in the dialysates were determined. So, the recovery rate for dopamine across the microdialysis membrane was 13.2 ± 0.7%

To assess the amount of clothianidin that cross the dialysis membrane, the recovery rate for this substance through the microdialysis probe was also estimated *in vitro*. In this case, clothianidin (3.5 mM) was perfused through the dialysis probe at a flow rate of 1.5 µL/min. The probe was placed in an Eppendorf tube containing 1 mL of Ringer solution. The collected samples were measured by HPLC using ultraviolet (UV) detection. 20 µl of clothianidin solution was injected into the HPLC-UV system, which was equipped with a Jasco PU-1580 HPLC pump and a UV detector (HP series 1050). The separation of clothianidin was achieved using Dionex C18 reversed-phase columns, under isocratic conditions. Column was eluted with a mobile phase consisting of 40% acetonitrile in a 1 mmol sodium acetate buffer (pH = 6.7) at a flow rate of 2 mL/min. The recovery rate for clothianidin was 19.0 ± 0.9% for 20 minutes. So, the amount of clothianidin that crosses the microdialysis membrane is 1.05 nmol / min.

Results

The participation of NMDA glutamatergic receptors on clothianidin induced dopamine release was evaluated by administration of APV, a competitive antagonist of these receptors.

Intrastriatal administration of clothianidin (3.5 mM) produced an increase in striatal dopamine levels of 2462 ± 627%, with respect to basal levels.

APV administration (0.65 mM) has not produced statistically significant changes on extracellular dopamine levels in the striatum. In the experimental group, coadministration of 0.65 mM APV and 3.5 mM clothianidin generated an increase in extracellular dopamine levels of 1089 ± 243.5% ($P \leq 0.001$), compared to the basal levels. This increase was55.7%lower than the generated by clothianidin alone(Figure 1).

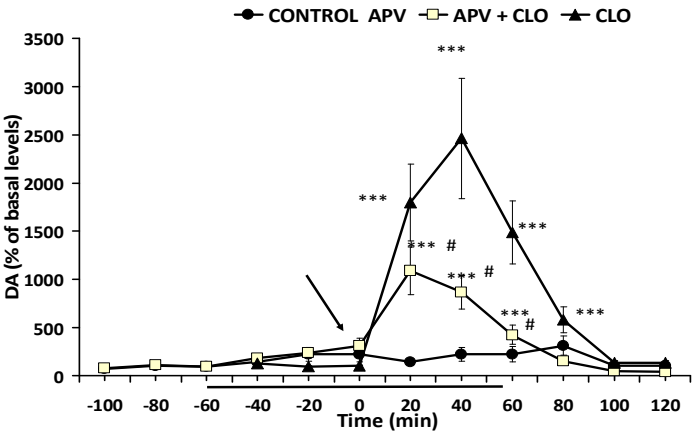


Figure 1. Effect of perfusion of 3,5 mM clothianidin and 0,65 mM APV on dopamine extracellular levels in the striatum. Infusion of APV is shown by the black bar and clothianidin infusion started at the time indicated by arrow. Dopamine levels are expressed as the variation of porcentage with respect to basal (100%), calculated as the mean of the two fist samples before the administration of the treatments. Values are mean ± S.E.M. (n = 5-7). Signification levels: $***P \leq 0.001$ respect to basal levels and $^{\#}P \leq 0.05$ respect to clothianidin group.

To investigate if the production of nitric oxide may be involved in the effects of clothianidin on the release of dopamine, we administered L-NAME, a NOS inhibitor, through the microdialysis probe.

The intrastriatal administration of L-NAME (0.1 mM) did not alter significantly the dopamine levels in the striatum. Coadministration of 0.1 mM L-NAME and 3.5 mM clothianidin generated a significant increase in extracellular dopamine levels of 836.5 ± 150.6% ($P \leq 0.001$), compared to the basal levels. This increase is 70% lower than the generated by clothianidin alone (Figure 2).

To test if reduced GSH (endogenous antioxidant) and DTT (with reactive -SH groups) could have any effect on dopamine release induced by clothianidin, each one of those substances was administered together with clothianidin through the microdialysis probe.

Administration of 0.4 mM GSH has not generated statistically significant changes on extracellular dopamine levels in the striatum. Coadministration of 3.5 mM clothianidin in combination with 0.4 mM GSH induced an increase in striatal dopamine levels of 465.6 ±

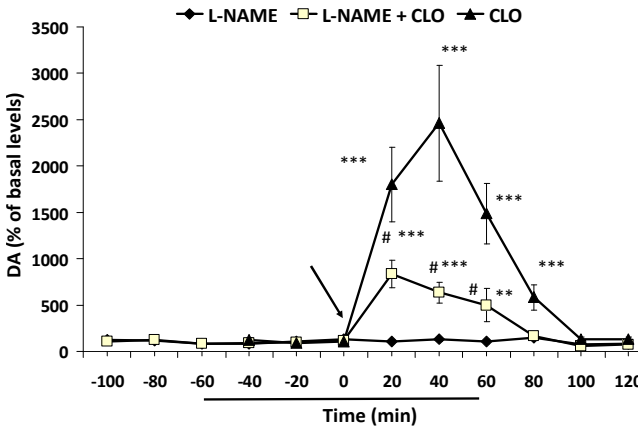


Figure 2. Effect of perfusion of 3,5 mM clothianidin and 0,1 mM on dopamine extracellular levels in the striatum. Infusion of L-NAME is shown by the black bar and clothianidin infusion started at the time indicated by arrow. Dopamine levels are expressed as the variation of porcentage with respect to basal (100%), calculated as the mean of the two fist samples before the administration of the treatments. Values are mean ± S.E.M. (n = 5-7). Signification levels: $^{***}P \leq 0.001$ respect to basal levels and $^{\#}P \leq 0.05$ respect to clothianidin group.

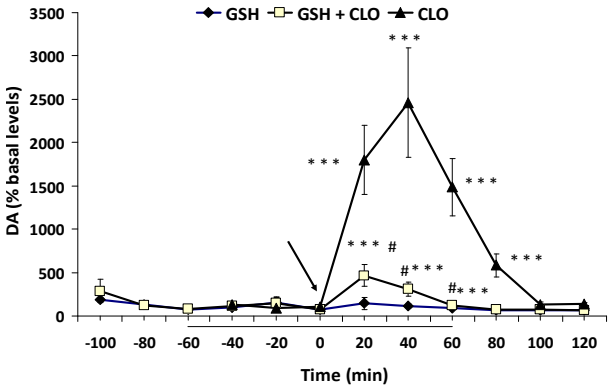


Figure 3. Effect of perfusion of 3,5 mM clothianidin and 0,4 mM glutathione on dopamine extracellular levels in the striatum. Infusion of glutathione is shown by the black bar and clothianidin infusion started at the time indicated by arrow. Dopamine levels are expressed as the variation of porcentage with respect to basal (100%), calculated as the mean of the two fist samples before the administration of the treatments. Values are mean ± S.E.M. (n = 5-7). Signification levels: $^{***}P \leq 0.001$ respect to basal levels and $^{\#}P \leq 0.05$ respect to clothianidin group.

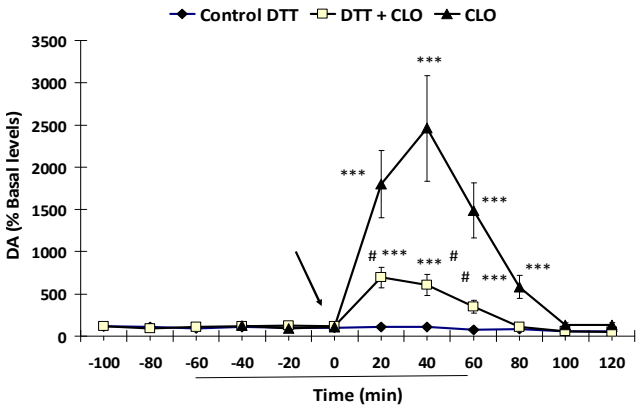


Figure 4. Effect of perfusion of 3,5 mM clothianidin and 0,005 mM dithiothreitol on dopamine extracellular levels in the striatum. Infusion of dithiothreitol is shown by the black bar and clothianidin infusion started at the time indicated by arrow. Dopamine levels are expressed as the variation of porcentage with respect to basal (100%), calculated as the mean of the two fist samples before the administration of the treatments. *Values are mean ± S.E.M. (n = 5-7). Signification levels:* $^{***}P \leq 0.001$ respect to basal levels and $^{\#}P \leq 0.05$ respect to clothianidin

126.8% ($P \leq 0.001$), with respect to basal levels. This result indicates that the administration of GSH results in an inhibition of 81% in the effect generated by the infusion of clothianidin alone (Figure 3).

Administration of 0.005 mM DTT has not produced significant alterations in the striatal dopamine levels. Administration of 3.5 mM clothianidin associated with 0.005 mM DTT induced an increase in extracellular dopamine levels in the striatum of 693.8 ± 117.8% ($P \leq 0.001$), with respect to basal levels. This increase is 72% lower that the generated by clothianidin alone (Figure 4)

Discussion

It is known that the striatum is a central region that receives inputs from the cerebral cortex, thalamus and substantia nigra, and that glutamate is released from the terminals of the cerebral cortex and in a less amount in the thalamus [16]. *In vivo* and *in vitro* studies suggest that activation of NMDA glutamatergic receptors facilitates the release of dopamine in the striatum of rats [17-18] and that stimulation of these receptors in the dopaminergic terminals induces release of dopamine [19].

In our experiments, we assessed the potential involvement of NMDA glutamatergic receptors in clothianidin-induced dopamine release in the striatum. Thus, administration of clothianidin in animals pre-treated with APV, a competitive antagonist of NMDA receptors [20-22], reduced a 55.7 % the extracellular dopamine levels induced by clothianidin. These results may indicate that the *in vivo* release of dopamine induced by clothianidin is partially dependent on the activation of NMDA glutamatergic receptors.

Moreover, there are *in vitro* and *in vivo* evidences that the dopaminergic system is influenced by nitric oxide. These results were obtained from *in vitro* [23-26] and *in vivo* studies (27 [26-30]. Furthermore, the striatum is characterized as an area with a high density of NMDA glutamatergic receptors [31] and with a high activity of NOS [32].

Therefore, in this work, we also evaluated the possible involvement of nitric oxide in the effect of clothianidin on striatal dopamine release using a NOS inhibitor. So, the administration of clothianidin in animals pretreated with L-NAME (an inhibitor of NOS), reduced a 70 % the extracellular dopamine levels induced by clothianidin.

Both results obtained by us, taken together, may indicate that the *in vivo* release of dopamine induced by clothianidin is partially dependent on the activation of NMDA glutamatergic receptors and the production of nitric oxide in rat striatum. So, activation of NMDA receptors in nitrergic neurons induces calcium input into the terminal; calcium binds to calmodulin, originating calcium-calmodulin complexes, activating the NOS and inducing the production of nitric oxide ([33]. Nitric oxide is a neuromediator which diffuses from the neuron that produces it, and enters in surrounding neurons to produce their effects. One of its target cells is the dopaminergic neuron [29], in which nitric oxide stimulates dopamine release [25-26].

Based on our results we can infer that clothianidin may be inducing the release of dopamine in the striatum via two mechanisms:

1) Clothianidin may be acting on cholinergic receptors located on glutamatergic terminals, stimulating the release of glutamate. Glutamate released would act on NMDA receptors present on dopaminergic terminals enabling and facilitating the release of dopamine.

2) Clothianidin may be inducing the release of glutamate in glutamatergic terminals by activating cholinergic receptors present in these terminals. Glutamate, in turn, would act on NMDA receptors in nitrergic neurons, activating NOS and producing nitric oxide, which would act directly on the dopaminergic neuron facilitating dopamine release.

Therefore, blocking NMDA receptors or inhibiting NO production it would be produced a decrease in the clothianidin effect on dopamine release.

The mechanism by which nitric oxide increases dopamine levels is not well clarified. Some authors have suggested that nitric oxide causes a reduction in the activity of the dopamine transporter (DAT), thereby increasing extracellular dopamine levels [33], which represents a new way in the interneuronal communication without any communication mediated by synaptic receptors [34] By contrast, others authors have suggested that the main interneuronal effect of nitric oxide is the activation of the enzyme guanylate cyclase, which triggers an increase in the cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which, in turn, causes increased levels of dopamine by activation of Ca^{2+} channels [35 -38].

However, the inhibition of NMDA receptors, as well as the inhibition of NO production, partially decreased but does not completely block the effect of clothianidin on the release of dopamine in the striatum. This would indicate that such mechanisms would be complementary and not the only ones generating the effect of clothianidin on dopamine release.

GSH is an essential tripeptide in mammalian cells, which plays an important role in cellular resistance to oxidative damage, through the provision of enzymes involved in the metabolism of ROS. GSH eliminates potentially toxic products originated from the oxidative reactions, by reducing their oxidized thiol groups to disulfide groups, in the presence of oxygen. It is considered an important agent for protection against aggressions produced by chemical agents [8]

Because a common approach to oxidative stress research is exogenous administration of compounds that have antioxidant properties, to test if GSH and DTT could have any effect on striatal dopamine release induced by clothianidin, each one of two substances were given together with the pesticide through the microdialysis probe.

The results showed that the administration of GSH produced a reduction (81%) of dopamine release induced by clothianidin. Similarly, DTT administration together with clothianidin generated an increase in extracellular dopamine levels 72% lower than that generated by clothianidin alone.

These results are consistent with other *in vivo* microdialysis studies that demonstrated the protective effects of GSH on the striatal dopamine release in animals treated with pesticides or other neurotoxic substances, such as mercury [39-40].

So, the decrease in dopamine release observed after pretreatment with antioxidants could occur through a direct binding of these compounds with clothianidin. This would result in a reduced availability of the pesticide to interact with nicotinic receptors, generating a smaller effect on dopamine release.

An interaction between antioxidant and toxics as a possible mechanism of protection against neurotoxicity was observed in a comparable study conducted by Faro et al (2005). They observed a decrease in the mercury-induced *in vivo* release of striatal dopamine in animals pretreated with GSH and cysteine. However, the observed decrease was significantly greater when GSH was given with mercury (without pretreatment) that when administered prior to mercury (pre-treatment). According to these authors, the greatest protective effect observed when mercury was coadministered with GSH may mean that the two substances interact before reaching the striatum (still in the syringe of microdialysis), which would reduce the effective concentration of the toxic [39]

Another possibility to explain the protective effect observed by us is that the antioxidants could interact with the cholinergic receptors. In this regard, in a study conducted in superior cervical ganglia of rat, Kwiatkowski and Brown (1976) observed that DDT acts on nicotinic receptors altering their properties, decreasing the membrane depolarization induced by carbacol, a neuronal nicotinic agonist. Similarly, the antioxidants used in this study, including DDT, could be altering, in some way, certain properties of nicotinic receptors. Because the alteration of these receptors, the pesticide can present difficulties when binding to those receptors, and consequently it can induce a lower neuronal membrane depolarization and decrease the release of dopamine in the striatum.

Our study demonstrates that neonicotinoids not only generate effects on the neurological system of mammals (dopaminergic neurotransmission) but also these effects appear to be significantly reversed by exogenous administration of certain antioxidants, which suppose a simple protection mechanism against the damage caused for such type of insecticides.

Acknowledgment

The research was supported by grant (Contract-Program) from University of Vigo (0022 122F641.02).

Bibliography

1. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M., Sattelle D.B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22: 573-580.

2. Ford K.A. Casida J.E. (2006). Unique and Common Metabolites of Thiamethoxam, Clothianidin, and Dinotefuran in Mice. *Chemical Research in Toxicology*, 19: 1549-1556.

3. Rodrigues K.J.A., Santana M.B., Do Nascimento J.L.M., Picanço-Diniz D.L.W., Maués L.A.L., Santos S.N., Ferreira V.M.M., Alfonso M., Durán R., Faro L.R.F. (2010). Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 101–107.

4. Bhardwaj S., Srivastava M.K., Kapoor U., Srivastava L.P. (2010). A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1185–1190.

5. Abou-Donia M.B., Goldstein L.B., Bullman S., Tu T., Khan W.A., Dechkovskaia A.M., Abdel-Rahman A.A. (2008). Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health (A)*, 71: 119-130.

6. Oliveira, I.M., Nunes, B.V.F., DURAN, R., Alfonso, M., Faro, L.R.F. (2010) Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on *in vivo* dopamine release in rat striatum. Toxicol. Lett. 192: 294-297.

7. Faro L.R.F., do Nascimento J.L.M., Campos F., Vidal L., Alfonso M., Durán R. (2005). Protective effects of glutathione and cysteine on the methylmercury-induced striatal dopamine release in vivo. *Life Sciences*, 77: 444-451.

8. Rossi R., Dalle-Donne I., Milzani A., Giustarini D. (2006). Oxidized Forms of Glutathione in Peripheral Blood as Biomarkers of Oxidative Stress. *Clinical Chemistry*, 52: 1406–1414.

9. Shen K., Ji L., Chen Y., Yu Q., Wang Z. (2011). Influence of glutathione levels and activity of glutathione-related enzymes in the brains of tumor-bearing mice. *BioScience Trends*, 5: 30-37.

10. Kerksick C., Willoughby D. (2005). The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl- Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2: 38-44.

11. Requejo R., Hurd T.R., Costa N.J. Murphy M.P. (2010). Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant

intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 277: 1465–1480.

12. Brown D.A., Kwiatkowski D. (1976). A Note on the Effect of Dithiothreitol (DTT) on the Depolarization of Isolated Sympathetic Ganglia by Carbachol and Bromo-Acetylcholine. *British Journal of Pharmacology*, 56: 128-130.
13. Assaf-Anid N., Hayes K.F., Vogel T.M. (1994). Reductive Dechlorination of Carbon Tetrachloride by Cobalamin(II) in the Presence of Dithiothreitol: Mechanistic Study, Effect of Redox Potential and PH. *Environmental Science Technology*, 28: 246-252.
14. Hara S., Mukai T., Kuriiwa F., Iwata N., Yanase T., Kano S., Endo T. (1997). Distinct effects of MK-801 and (±)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid on N-methyl-D-aspartate-induced rise of brain temperature in rats. *Life Sciences*, 61: 289-294.
15. Durán R., Alfonso M. and Arias B. (1998). Determination of biogenic amines in rat brain dialysates by hight performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography Technology*, 21: 2799-2811.
16. Cepeda C., André V.M., Jocoy E.L., Levine M.S. (2009). NMDA and Dopamine: Diverse Mechanisms Applied to Interacting Receptor Systems. In: Van Dongen A.M.. Biology of the NMDA Receptor. *Boca Raton CRC Press*. Bookshelf ID: NBK5280 PMID: 21204414.
17. Carrozza D.P., Ferraro T.N., Golden G.T., Reyes P.F., Hare T.A. (1992). In vivo modulation of excitatory amino acid receptors: microdialysis studies on N-methyl-D-aspartate-evoked striatal dopamine release and effects of antagonists. *Brain Research*, 574: 42-48.
18. Wintton P.S., Maione S., Big C.S. Fowler LL (1994). N-methyl-d-aspartate receptors modulate extracellular dopamine concentration and metabolism in rat hippocampus and striatum in vivo. *Brain Research*, 635: 312-316
19. Parker J.G., Zweifel L.S., Clark J.J., Evans S.B., Phillips P.E.M., Palmiter R.D. (2010). Absence of NMDA receptors in dopamine neurons attenuates dopamine release but not conditioned approach during Pavlovian conditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 13491-13496
20. Baunez C., Amalric M. (1996). Evidence for functional differences between entopeduncular nucleus and substantia nigra: effects of APV (DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid) microinfusion on reaction time performance in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 8: 1972-1982.
21. Getz E.B., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P.R. (1999). A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry*, 273: 73–80.
22. Laurent V., Westbrook R.F. (2009). Infusion of the NMDA receptor antagonist, DL-APV, into the basolateral amygdale disrupts learning to fear a novel and a familiar context as well as relearning to fear an extinguished context. *Learning and Memory*, 16: 96-105.
23. Hanbauer I., Wink D., Osawa Y., Edelman G.M., Gally J.A. (1992). Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *NeuroReport Journal*, 3: 409-412.
24. Lonart G., Johnson K.M. (1994). Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [3H]-dopamine and [3H]-glutamate by striatal synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, 63: 2108-2117.
25. Kiss J.P., Vizi E.S. (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. Trends in Neuroscience, 24: 211-215.
26. Kiss J.P., Hennings E.C., Zsilla G., Vizi E.S. (1999). A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. *Neurochemistry International*, 34: 345-350.
27. Lorrain D.S., Hull E.M. (1993). Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *NeuroReport Journal*, 5: 87-89.
28. Strasser A., McCarron R.M., Ishii H., Stanimirovic D., Spatz M. (1994). L-arginine induces dopamine release from the striatum *in vivo*. *NeuroReport Journal*, 5: 2298-2300.
29. West A.R., Galloway M.P. (1997). Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Neuropharmacology*, 36: 1571-1581.
30. Iravani M.M., Millar J., Kruk Z.L. (1998). Differential release of dopamine by nitric oxide in subregions of rat caudate putamen slices. *Journal of Neurochemistry*, 71: 1969-1977.
31. Greenamyre J.T., Olson J.M.M., Penney J.B., Young A.B. (1995). Autoradiographic characterization of N-methyl-d-aspartate-quisqualate and kainite-sensitive glutamate binding sites. *Journal of Pharacology and Experimental Therapeutics*, 223: 254-263.
32. Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T., Snyder H.S. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH-diaphorase. *Neuron*, 7: 615-624.
33. Hong J.T., Kim H.C., Kim H.S., Lee Y.M., Oh K.W. (2005). The role of nitric oxide on glutaminergic modulation of dopaminergic activation. *Pharmacological Research*, 52: 298-301.
34. Pogun S., Brenman M.H., Kuhar M.J. (1994). Nitric oxide inhibits [3H]-dopamine uptake. *Brain Research*, 641: 83-91.
35. Kiss J.P., Zsilla G., Vizi E.S. (2004). Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. *Neurochemistry International*, 45: 485-489.
36. Phillips P.E., Stamford J.A. (2000). Differential recruitment of N-, P- and Q type voltage-operated calcium channels in striatal dopamine release evoked by regular and burst firing. *Brain Research*, 884: 139-144.
37. Khan S.A., Hare J.M. (2003). The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca2+ cycling. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 6: 658-666.
38. Trimmer J.S., Rhodes K.J. (2004). Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annual Review of Physiology*, 66: 477-519.
39. Rocchitta G., Migheli R., Mura M.P., Grella G., Esposito G., Marchetti B., Miele E. Desole M.S., Miele M., Serra P.A. (2005). Signaling pathways in the nitric oxide and iron-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: role of extracellular Ca2+ and L-type Ca2+ channels. *Brain Research*, 1047: 18-29.
40. Faro, L.R.F., Oliveira, I.M., DURAN, R., Alfonso, M. (2012) In vivo neurochemical characterization of clothianinin induced striatal dopamine release. Toxicology 302: 197-202.
41. Vidal, L., Duran, R., Faro, L.R.F., Campos, F., Cervantes, R.C., Alfonso, M. (2007) Protection from inorganic mercury effects on the *in vivo* dopamine release by ionotropic glutamate receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors. Toxicology 238: 140-146.

Valoración físico-química y fitotóxica de las aguas residuales depuradas/regeneradas destinadas al riego agrícola

Pérez Donato J.A.[b], Vera L. [c], Bravo Sánchez L.R.[b] Delgado Díaz S.[a], González Cabrera E.[a]

[a]*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química, Universidad de La Laguna*
[b] *Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas , Santa Clara, Cuba.*
[c] *Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca . Ecuador.*
[d] *Universidad Amazónica de Puyo. Ecuador.*

Resumen: La aplicación más extendida de la reutilización de aguas residuales domésticas depuradas/regeneradas es el riego agrícola. Las normativas comunes sobre calidad de aguas regeneradas para reutilización contemplan parámetros físico-químicos y biológicos para minimizar riesgos sanitarios, pero pocas veces tienen en cuenta parámetros fitotóxicos que pueden ser limitantes para aplicaciones agrícolas. Los parámetros físico-químicos y fitotóxicos cambian al avanzar en el grado de depuración/regeneración de las aguas residuales, por lo que resulta de interés conocer que etapa de la instalación proporciona el agua adecuada para el riego. Este trabajo presenta un estudio de correlación de fitotoxicidad con parámetros físico-químicos en agua de muestras tomadas al final de cada una de las etapas de tratamiento convencional de aguas residuales domésticas, que incluye reactor biológico de lodos activados y tratamiento terciario con filtración de arena, cloración, filtración en cartucho y desalinización por electrodiálisis reversible.En cada muestra se midió: demanda química de oxígeno, pH, conductividad, carbono orgánico, fósforo total, proteínas solubles, y los iones de Na, K, Ca, Mg, B, F y Cl. Los criterios de fitotoxicidad se evaluaron mediante el biomarcador *Lactuca sativa.*Los resultados mostraron reducciones importantes de los parámetros físico-químicos en el proceso de electrodiálisis, mientras que los efectos de fitotoxicidad mostraron reducciones en los procesos anteriores a la etapa final de electrodiálisis. Se concluye que los parámetros físico-químicos, conjuntamente con el marcador biológico, constituyen aspectos de interés práctico que relaciona el tipo de tratamiento con la calidad físico-química y la fitotoxicidad del agua depurada/regenerada obtenida y su idoneidad para aplicaciones de riego agrícola.

Palabras claves: fitotóxicos, reutilización, riego agrícola, electrodiálisis.

Abstract: The most widespread application of reuse of treated / reclaimed domestic wastewater is agricultural irrigation. The common regulations on quality of reclaimed water for reuse contemplated physicochemical and biological parameters to minimize health risks, but rarely taken into account phytotoxic parameters that may be limiting for agricultural applications. The physicochemical and phytotoxic parameters change to advance the degree of purification / regeneration of wastewater, so it is of interest to know what stage of the installation provides adequate water for irrigation. This paper presents a correlation study of phytotoxicity with physicochemical parameters in water samples taken at the end of each of the stages of conventional treatment of domestic sewage, including biological reactor activated sludge treatment and tertiary sand filtration, chlorination, filtration cartridge and desalination by electrodialysis reversal. In each sample was measured. Chemical oxygen demand, pH, conductivity, organic carbon, total phosphorus, soluble proteins and ions of Na, K, Ca, Mg, B, F and Cl criteria phytotoxicity were evaluated by *Lactuca sativa* biomarker.Results showed significant reductions in physicochemical parameters of electrodialysis process, while the effects of phytotoxicity showed reductions in the processes before the final stage of electrodialysis.We conclude that the physico-chemical, together with the biomarker parameters are aspects of practical interest that relates the type of treatment with physical-chemical quality and phytotoxicity of treated / reclaimed water obtained and their suitability for agricultural irrigation applications.

Key words: phytotoxic, reuse, irrigation, electrodialysis.

Introducción

Un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales es la utilización de bioensayos, ya que los organismos vivos presentan algunas respuestas anómalas al exponerse a niveles por encima de determinados umbrales de seguridad (1). Diversos estudios han demostrado la presencia de los denominados ¨contaminantes emergentes¨ en las aguas residuales depuradas utilizadas en riego agrícola. Para la mayoría de los compuestos identificados se les desconoce sus efectos adversos sobre la biota (2).

Los Bioensayos ¨ *in Vitro* ¨ han ganado aceptación en las estrategias de biomonitoreo, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, son costo-efectivo, simples y rápidos (3,4). En las últimas décadas se han desarrollados bioensayos rápidos con el empleo de plantas como organismos de prueba, las que funcionan como buenas herramientas de trabajo para el monitoreo ambiental (5,6).

Este trabajo combina la evaluación de parámetros físicos-químicos y de fiotoxicidad de agua residual depurada/regenerada destinada al riego agrícola. Se monitorean los factores antes referidos en los diferentes procesos tecnológicos de tratamientos (secundario y terciario) y su correlación con el bioensayo de fitotoxicidad (con la misma secuencia de muestreo) utilizando *Lactuca sativa* como biomarcador de toxicidad (7).

La justificación para realizar este bioensayo radica en la importancia de eventos de desarrollo temprano en el crecimiento y supervivencia de las plantas. La prolongación de la raíz es inhibida a concentraciones más bajas de las sustancias tóxicas que para el caso de la germinación de la semilla; por lo tanto, puede ser un indicador más sensible de efecto biológico, se emplean diversas especies, pero el ensayo con *Lactuca sativa* es una de las más intercalibrada por los laboratorios a nivel internacional (8).

Materiales y métodos

Prueba de fitotoxicidad a corto plazo con la planta Lactuca sativa

El bioensayo con semilla (Lactuca sativa), clasificado como estático de toxicidad aguda (120 horas de exposición). En el que se evalúa el efecto fitotóxico de un compuesto puro o una mezcla compleja en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxico, se determina la inhibición de la germinación, así como la inhibición en la elongación de la raíz y el hipocotilo. Esto permite evaluar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que si pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la raíz o el hipocotilo, lo que depende del modo y lugar de acción de los contaminantes.

Este ensayo permite además monitorear las aguas residuales en diferentes momentos del proceso tecnológico de depuración.

Control de calidad del bioensayo

*e-mail: mayrav81@yahoo.es

El bioensayo con L. sativa parte de un criterio básico que consiste en garantizar la calidad del lote de semillas suministradas por un proveedor que garantice la no utilización de productos químicos en su conservación. Las semillas de L. sativa var. BSS (Black Seed Simson) subvariedad Fomento utilizadas se acompañaron de una certificación de calidad que declara un poder germinativo de 100% para el lote. La recepción y almacenamiento en el laboratorio cumplió con las normas protocolizadas. Las semillas seleccionadas para el ensayo cumplieron con criterios de aspecto (color, forma y tamaño) y rango de peso, rechazando las que no cumplan con estos parámetros (5,6).

Previo a la implementación de la prueba se verificó el porcentaje de germinación de las semillas el cual se comportó en un rango de aceptación (99%), es decir por encima de 90% que es el requerimiento exigido. Además se evaluó el coeficiente de variabilidad (CV) del crecimiento de la radícula y del hipocotilo, el que mostró una variabilidad de 17% con rangos entre 20 y 14 por ciento. Un coeficiente de 20% o inferior se considera bueno, siendo 30% el límite de aceptación del lote para poder ser utilizado en el bioensayo. El experimento se desarrolla en ausencia de luz y a temperatura de 21± 1 ºC en cámara oscura termostatizada. Previamente se caracterizaron las condiciones de fotoblastismo negativo y la temperatura optima de germinación, así como rangos de dosis para estimar la CI_{50} del sulfato monoidratado de zinc (tóxico de referencia) para la elongación de la raíz y el hipocotilo.

La carta control (anexo I: tabla 3, gráfico 1) se conformó realizando el cálculo de la CI_{50} (para un intervalo de confianza de 95 %) a muestras del lote de semillas de forma periódica (todos los meses), con el objetivo de comprobar su sensibilidad al tóxico de referencia. Cuando el cálculo de la CI_{50} se ubica fuera de ± 2 (Desviación Típica) con relación al promedio se considera que el marcador no cumple con los estándares de calidad para el bioensayo (5,9). En el presente ensayo la carta control respalda la calidad de las semillas en cuanto a sensibilidad de respuesta al tóxico de referencia lo que se refleja en el anexo I (tabla 3 y gráfico 1).

Protocolo de bioensayo

Se inicia inmediatamente después de ser recepcionadas las muestras por el laboratorio y en paralelo con las determinaciones fisicoquímicas, con la salvedad que este se extiende por un periodo de 120 horas (cinco días). Se utilizan placas desechables de Petri (100mm de diámetro), papel de filtro Whatman número 3 (90 mm) colocando 20 semillas por placas y aplicando 4 mililitros de agua por placa tanto para muestras investigadas como grupo control negativo (agua ¨Milli-Q¨ reconstituida (10) y se procede según protocolo basado en la US EPA, 1989 (11).

Muestras de agua residual

Las muestras de aguas residuales que se utilizaron para los experimentos se tomaron en los meses de julio y agosto (3 muestreos) en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) de la isla de Tenerife (Islas Canarias, España). Las muestras fueron obtenidas en el siguiente orden: posteriores a, reactor biológico de lodos activados y tratamiento terciario con filtración de arena, cloración (sólo utilizada para la determinación de conductividad e iones y no para el resto de los parámetros investigados), filtración en cartucho y desalinización por electrodiálisis reversible.

Determinación de indicadores fisicoquímicos

Las muestras clasificadas como compuestas / 24 horas, fueron transportada al laboratorio donde se inició inmediatamente las determinaciones fisicoquímicas. La evaluación analítica de los diversos indicadores de contaminación físico-química ha sido realizado a temperatura ambiente (25 º C) y por duplicado a cada muestra. Las determinaciones se realizaron utilizando métodos protocolizados que tienen como base Standard métodos for the examination of water and wastewater edition 21th, 2005 (12), AENOR (1997) (13) y Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en agua (14). La turbidez se midió con el turbidímetro HACH 2100N y el pH con un WTW inoLabLevel.

Procesamiento estadístico

La evaluación de la fitotoxicidad en el bioensayo se realizó en base a la medición de la elongación de la raíz y al hipocotilo. El agua investigada (muestra) se comparó con el control negativo que utilizó agua ¨Milli-Q¨ restituida, estimando de esta forma el por ciento de inhibición (PI), para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$PI = (\text{muestra} - \text{control}/\text{control}) \times 100$$

Los valores positivos y negativos del por ciento de inhibición (PI) indican crecimientos anormales y son interpretados como criterio de toxicidad para la muestra evaluada, por otra parte los valores de cero o próximo a este se consideran no tóxicos (8).

El procesamiento estadístico se realizó en Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017. El análisis de correlación (tablas 1 y 2) se realizó comparando los valores de las lecturas de parámetros fisicoquímicos con respecto al efecto fitotóxico sobre L. sativa (elongación de raíz e hipocotilo).

La carta control anexo I (tabla 3 y grafico1) se conforma con los valores la DI_{50}. Cada dosis se obtiene por experimentos independientes de dosis-efecto inhibitorio y aplicando el método de Lietfield y Wilcoxon (6). A los 12 valores DI_{50} obtenidos en los controles periódicos con el biomarcador (semilla de L. sativa) se le determinó el promedio, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV), así como los puntos de máximo y mínimo de aceptación para certificar la calidad de la semilla (±2δ).

Resultados y discusión

Las tendencias en la reutilización de aguas residuales se dirigen en tres líneas de actuación según tipo de uso, seguridad y tecnología. Estas tres líneas de actuación están relacionadas entre sí, pues la tecnología a utilizar depende del tipo de uso del agua regenerada, y de los criterios de calidad físico- químico y sanitario que requiera cada aplicación (15).

Con respecto a la seguridad en el uso de las aguas residuales una vez regeneradas se dispone de una gran variedad de guías sanitarias para los diferentes usos ya establecidos. Sin embargo, no existe uniformidad de criterios y cada país o estado propone una norma para un uso concreto que en muchas ocasiones difiere de la de otro país para el mismo uso. Las tendencias en este campo van encaminadas al establecimiento de una guía unificada, basada en criterios de análisis de riesgo real en los usos convencionales de este tipo de recurso hídrico (15).

Como aspecto a señalar en el estudio está el hecho que la germinación de las semillas no sufrió afectaciones y se comportó semejante al grupo control. Los resultados de afectación fitotóxica se manifestaron sobre la radícula y el hipocotilo donde las lecturas de elongación resultaron inhibitoria para todas las muestras (tablas 1,2). Lo anterior indica que los efectos tóxicos de las aguas residuales sobre las semillas no fueron drásticos y se clasifican como subclínicos. Los resultados de los estudios físico-químicos (DQOt, DQOs, pH, COT, conductividad, turbidez, proteínas y polisacáridos) como indicadores de la calidad y su correlación con el parámetro de efecto fitotóxicos de las diferentes muestras se expresan en la tabla 1. Las lecturas para la elongación de la raíz y el hipocotilo en dicha tabla resultaron inhibitorias al ser comparadas con el control negativo, además se establece un coeficiente de correlación aceptable para ambos órganos de la plántula (radícula-hipocotilo), siendo el porciento de inhibición más marcado para la raíz. En dicha tabla se aprecia por una parte la correlación existente entre los parámetros pH, conductividad, TOC y DQO (S) con la fitotoxicidad expresada como inhibición de la elongación de la radícula. Por otra parte para el hipocotilo los resultados en cuanto a las correlaciones existentes entre parámetros

fisicoquímicos y de fitotoxicidad difieren con el resultado obtenido para la raíz, pues la correspondencia se establece para DQO_S, DQO_t y pH. De los resultados expuestos anteriormente cabe destacar que la DQO_S y pH mostraron correlación con la inhibición de la elongación de la raíz y el hipocotilo.

La tabla 2 muestra los coeficientes de correlación entre la concentración de los iones Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, Mg Mg^{2+} y F con los por cientos de inhibición de la elongación de la raíz y del hipocotilo

Tabla 1: Coeficiente de correlación entre parámetros físico-químicos y por ciento de inhibición (PI) de elongación de la raíz y del hipocotilo. Así como coeficiente de correlación del PI entre raíz e hipocotilo.

muestra	DQOt mg/L	DQO_s mg/L	pH	COT mg/L	Cond. µS/cm	Turb. unt	Prot. mg/l	Polis. mg/L	Raíz PI	Hipoc. PI
RBLA[a]	65	64	7.76	10.87	1419	3.13	2.65	3.7	46.6	30.23
FA[b]	25	29	7.83	10.59	1442	2.38	2.00	3.11	34.9	12.19
FC[c]	38	29	7.56	11.65	1731	3.66	2.92	8.46	26.3	5
DER[d]	40	30	7.24	9.24	557	2.29	2.51	2.99	3.9	0.5
r/raíz-hipoc.									0.87	
r/raíz	0.40	0.65	0.93	0.70	0.76	0.44	-0.04	0.09	–	
r/hipoc.	0.71	0.92	0.71	0.34	0.39	0.22	0.38	0.25	–	

a. Reactor biológico de lodos activados
b. Filtro de arena
c. Filtración en cartucho
d. Desalinización por electrodiálisis reversible
PI. Por ciento de inhibición de la elongación
r. Coeficiente de correlación

Tabla 2: Coeficiente de correlación entre parámetros físico-químicos (cationes y aniones), así como por ciento de inhibición (PI) de elongación de la raíz y del hipocotilo. Así como coeficiente de correlación del PI entre raíz e hipocotilo.

muestra	Na^+ mg/l	K^+ mg/l	Ca^{2+} mg/l	Mg^{2+} mg/l	B^{-} mg/l	F^- mg/l	Cl^- mg/l	Raíz PI	Hipocotilo PI
RBLA[a]	259	24.3	13.8	18.5	0.2	0.3	301	46.6	30.23
FA[b]	259	24.5	13.7	18.5	0.2	0.3	302	34.9	12.19
C[c]	257	24.1	13.6	18.1	0.23	0.3	336	33.9	11.8
FC[d]	273	25.5	14.9	19.8	0.2	0.2	308	28.3	5
r/raíz-hipoc								0.85	
r/raíz	0.88	0.88	0.87	0.86	0.13	0.7	0.88	–	
r/hipoc.	0.5	0.52	0.52	0.53	-0.01	0.56	0.51	–	

a. Reactor biológico de lodos activados
b. Filtro de arena
c. Cloración
d. Filtración en cartucho
e. Desalinización por electrodiálisis reversible
PI. Por ciento de inhibición de la elongación
r. Coeficiente de correlación

respectivamente. Los coeficientes de correlación de los iones Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+},

Mg^{2+} y F^- con respecto a la elongación de la raíz fueron aceptables. Para el hipocotilo no se obtuvieron coeficientes de correlación que indique interdependencia marcada entre la concentración de estos iones con el efecto de fitotoxicidad.

El análisis de los resultados en las tablas 1 y 2 indican que la raíz de la planta *L. sativa* resultó ser un biomarcador más sensibles al efecto fitotóxico que el hipocotilo tomando como referencia el porciento de inhibicion.

En lo referente al proceso tecnológico la desalinización por electrodiálisis reversible resultó ser la que genero el agua que no mostró efecto fitotóxico. Esto debido a la reduccion la mayoría de los parámetros fisicoquímicos evaluados (Tablas 1,2)

Los parámetros fisicoquímicos se han encontrado usualmente en los estándares. Estos generalmente contemplan las medidas de turbidez, pH, conductividad, sólidos en suspensión,

DBO y DQO y nutrientes. Puesto que estos estándares se han definido siempre en función de los criterios sanitarios y no agroquímico han sido cuestionados en lo referente al alcance (16).

Actualmente existe un interés creciente por los "contaminantes emergentes", entre los que se encuentran surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas y subproductos de la desinfección del agua. Estos contaminantes presentes en las aguas reutilizadas pudieran ser regulados para el riego agrícola sobre la base de un riesgo potencial (17).

Conclusiones

Los estudios realizados se han orientado a la obtención de resultados que permitan relacionar parámetros físico-químicos y de fitotoxicidad (*L. sativa*) en función de aportar criterios ecotoxicológicos con relación a las aguas residuales depuradas/regeneradas con la finalidad de ser usada en el riego agrícola. Estas herramientas combinadas aportarían criterios de orientación en cuanto a la eficacia del proceso tecnológico en lo concerniente a la fitotoxicidad del producto agua. Como aspectos a destacar del estudio está en primer orden el hecho de que la radícula del biomarcador *L. sativa* resultó el órgano más sensible a los efectos fitotóxicos subletales agudos al compararse con el hipocotilo. Por otra parte la eficacia del proceso tecnológico quedó demostrada al reducirse el efecto fitotóxico de las muestras de aguas generadas en las diferentes etapas del proceso tecnológico del EDAR. En lo referente a la correlación estadística de interdependencia de las concentraciones de los pámetros fisicoquímicos de las muestras de agua con la fitotoxicidad, se expresa correlación positiva para el órgano raíz de los parámetros PH, conductividad, TOC, $DQO_{(s)}$, así como los iones Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, Mg^{2+} y F^- . Por otra parte el hipocotilo mostró correlación para los parámetros fisicoquímicos $DQO_{(t)}$, $DQO_{(s)}$ y pH, para el caso de los iones no se establecieron correlaciones destacables.

Incorporar bioensayos de fitotoxicidad en la evaluación de muestras de agua destinadas al riego agrícola sería una herramienta útil para caracterizar las mismas, en función de perfeccionar el proceso tecnológico y proteger el ecosistema donde se apliquen.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo financiero del Programa PCI de la AECI (Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo) y el proyecto CONVAGUA de Canarias por la Agencia ACIISI patrocinado por la Comisión Europea y el Gobierno de Canarias Regional. También quieren expresar su agradecimiento a GE Zenon, BALTEN, EMMASA y CANARAGUA por su colaboración.

Abreviaturas y nomenclatura

Cond. Conductividad
r. Coeficiente de correlación
DQO_{total} Demanda química de oxígeno total
DQO_s demanda química de oxígeno soluble (después de filtrada la muestra)
PI. Por ciento de inhibición de crecimiento de raíz o hipocotilo de *L. sativa*
EDAR. Estación depuradora de aguas residuales
TCO. Total de compuestas orgánicos
Turb. Turbidéz

Bibliografía

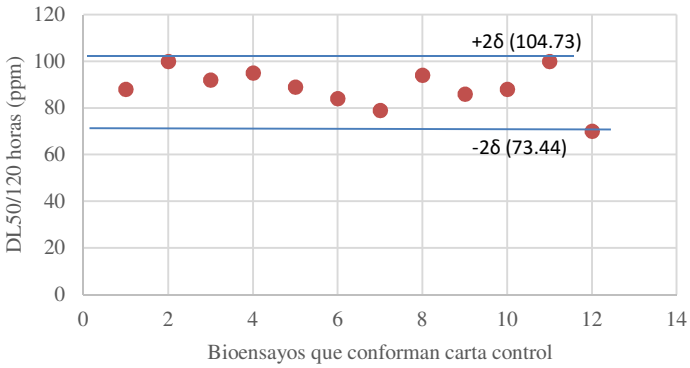
1. Fochtman P, Razaska A, Nierzedska E. The use of conventional bioassays microbiotets y some ¨raped¨ methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. Environm Toxicol 2000; (15):376-384
2. Peña-Alvarez A, Castillo-Alanis A. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuals por microextraccion en fase solida-cromatografica de gases-espectrometría de masas (MEFS-GC-EM). OIIP revista especializada de ciencias químico-biologicas, 2015. 18(I):29-42
3. Gusttavson KE, Sonsthagen SA, Crunkilton RA, Harkin JM, Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis. Environm Toxicol 2000; (15): 421-430
4. Lallana, MC, Billard CE. Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L): determinaciónde calidad de agua en represas para riego. Rev., FCAUNC XL. No 1 2008. 29-38
5. Ramirez-Romero P, Mendoza-Cantu A. Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de ecología. 1ra ed. México.2008. 55-67p. ISBN:978-968-817-882-9
6. Castillo-Morales G. Ensayos toxicológicos y métodos de validacion de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicación. Grabila Castillo/ed. 1ra edición. Centro internacional de investigacione para el desarrollo. Canadá. 2004. 186
7. Reynaldo IM, Jerez E, Torres J. Fitotoxicidad del aluminio en plántulas de arroz de la variedad LP-7. Contribución a la educación y protección ambiental. Cátedra de Medio Ambiente 2000;(1):89-93
8. Torres-Rodríguez MT, Garcia Milián M, Hernandez Perera NM, Fernandez Novo, M. Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa* L. Hig. Sanid. Ambient. 2006. 6: p 170-172
9. Bohorquez-Echeverry P, Campos-Pinilla C. Evaluación de *Lactuca sativa y Selenastrum capricornutum* como indicador de toxicidad aguda. Universidad Scientiarum, 2007: 12 (2)2 julio-diciembre. p 83-98
10. EPA OPPTS. Ecological effects test guidelines-Seed/germination/root elongation toxicity test, 850-4200.1996
11. US EPA Protocols for short-term toxicity testing of organic and inorganic pollution, Environmental protection Agency, 600/3 88/029, Corvallis. 1989.
12. APHA-AWWA-WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th edition. (New York; Washington DC) (2005).
13. AENOR. Calidad de agua. Medio ambiente, Tomo I. Recopilacion de normas UNG. Madrid. 1997. p 175-189
14. Severiche-Sierra CA, Castillo-Bertel ME, Acevedo-Barrios RL. Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en agua. Editor Fund. Univ. Andaluza. 2013.
15. Lazarova, V. and Bahri, K., CRC. Water reuse for irrigation Agriculture, Landscapes, and Turf Grass. CRC press, United States of America, 2005.
16. Solgat M, Folch M. Reutilización de aguas residuales. En Damia Barceló (Coord.) Aguas continentales. Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua (pp 175-196). Ed. Cyan, Proyectos y Producción Editoriales. SA. Madrid. 2008.
17. López de Alda MJ, Barceló D. Contaminantes orgánicos emergentes en aguas continentales y aspectos relacionados con el marco normativoy planificación hidrográfica en España. En Damia Barceló (Coord.) Aguas continentales. Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua (pp 91-117). Ed. Cyan, Proyectos y Producción Editoriales. SA. Madrid. 2008.

Anexo I

Tabla 3: Carta control *Lactuca sativa*

Tóxico de referencia: Zn II	
Bioensayo número	CL50 ppm
1	88
2	100
3	92
4	95
5	89
6	84
7	79
8	94
9	86
10	88
11	100
12	70
Promedio	88.75

Grafico 1. Cata control para L. sativa
Zn(II) sulfato monohidratado como tóxico de referencia



Toxicidad del Bisfenol A: Revisión

*Juan-García A. *, Gallego C., Font G.*

[a] *Laboratorio de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain*

Resumen: El Bisfenol A (BPA) es un compuesto químico muy utilizado en la industria. Se emplea como elemento y/o componente destinado a la fabricación de plásticos y resinas epoxi. Los plásticos y resinas producidas con BPA. se usa para la producción de recipientes con distintas aplicaciones, como puede ser; el envase de alimentos y bebidas, vajillas, papel térmico y dispositivos utilizados en el campo de la medicina, etc. Los seres humanos están expuestos a BPA de manera habitual, siendo la exposición a través de la dieta, (envases de comida y bebida) la fuente más importante de riesgo. Los materiales que permanecen en contacto con los alimentos son un punto clave de fuente contaminación, por ello deben estar evaluados y regulados para su utilización.
El BPA se considera un disruptor endócrino con capacidad de alterar funciones y sistemas del organismo. En los últimos años, diversos estudios han relacionado la exposición a BPA con la aparición de efectos adversos para la salud. La EFSA, en su última opinión científica a cerca del BPA, concluye que, este compuesto no presenta riesgos para la salud de los expuestos y por tanto, actualmente en la Unión Europea, el BPA se considera un producto autorizado para la utilización como material destinado a entrar en contacto con los alimentos. Sin embargo, se continúa investigando sobre el BPA y sus posibles efectos adversos. La presente revisión recoge los estudios más recientes, "*in vitro"* e "*in vivo"* sobre la toxicidad del BPA, agrupados en las categorías, donde se ha visto implicación del BPA, en el estado de salud, siendo estas: proliferación celular y cáncer, alteraciones en el desarrollo y maduración celular, estrés oxidativo y daño en el material genético y afectación a nivel metabólico, reproductivo, cardiovascular y neuronal.

Palabras Claves: Bisfenol A, envases, disruptor endócrino, toxicidad, exposición dietética.

Abstract: Bisfenol A (BPA) is a chemical compound commonly used in industry. It is generally used as an element and/or component in the manufacturing of plastics and epoxy resins. These plastics and resins are used in the manufacture of containers with different purposes, for example; in the packaging of food and drinks, crockery, thermic paper, devices used in the medical field etc. Human beings are commonly exposed to BPA, being the diet (food and drink packaging) the highest exposure factor and therefore a key contamination spot. For this reason it is necessary that the usage of materials which are in contact with food is properly evaluated and regulated.

BPA is considered a endocrine disruptor, with the capacity to alter functions and systems in the organism. Several studies have recently proposed a relation between the exposure to BPA and the appearance of adverse effects for the health. However, the EFSA recently concluded in their latest scientific opinion on the topic, that this compound does not imply any risk for the health of the exposed population. Therefore the EU considers BPA an authorised product to be used as material to enter in contact with food. However research on BPA and its potential negative effects is still ongoing. This review contains the latest ´´*in vitro*`` and ´´*in vivo*`` studies about BPA toxicity, these studies are grouped in the following categories (regarding different implications); cellular proliferation and cancer, alterations in development and cellular maturation, oxidative stress, damage to genetic material and finally alterations at a metabolic, reproductive, cardiovascular or neuronal level.

Keywords: Bisfenol A, packaging, endocrine disruptor, toxicity, diet exposition

*e-mail: ana.juan@uv.es

Introduction

1.1Bisfenol A

El Bisfenol A (BPA) [4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano] (Figura 1) es un compuesto químico comúnmente utilizado en la industria. Sus niveles de producción mundial alcanzan cifras elevadas y en 2006 se registró una producción de 3'8 millones de toneladas (Fitzgerald et al., 2014). Se obtiene por la condensación de dos moléculas fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico (Vandenberg et al., 2009). Fue sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin, pero hasta principios de 1930 no se conocieron sus propiedades y actividad estrogénica (Dodds & Lawson, 1989).

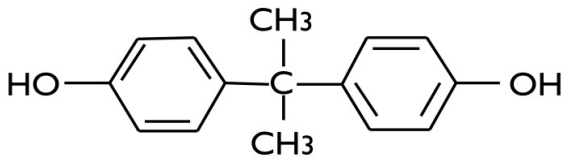


Figura 1. Estructura química del BPA

El BPA forma parte del grupo de compuestos disruptores endocrinos (DE) "sustancias exógenas al organismo que se encuentran en el medio ambiente, en los alimentos y en los productos destinados a los consumidores, que interfieren con la biosíntesis de hormonas, el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración en la homeostasia normal del individuo expuesto o en la de sus descendientes" (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Se ha demostrado que el BPA tiene afinidad por los receptores de los estrógenos y por tanto, posee la capacidad de producir efectos estrogénicos.

Es importante destacar que los efectos más graves de los DE, y por tanto del BPA, se han visto en niños y niñas de madres expuestas durante el embrazo y la lactancia, por ello muchos estudios se centran en la evaluación de la exposición prenatal y los efectos adversos en los niños (Braun et al., 2011).

El BPA y los DE siguen un comportamiento particular en sus curvas de dosis-efecto, es decir el efecto máximo se produce a dosis bajas; por lo que es de interés, evaluar y analizar los efectos que tienen lugar a concentraciones muy bajas (Vandenberg et al., 2012).

1.1 Aplicaciones y utilización

El BPA se utiliza como un elemento y/o componente destinado a la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi (Mileva et al., 2014). El policarbonato y las resinas son materiales dirigidos a la producción de objetos y recipientes destinados a entrar en contacto con los alimentos y bebidas, como pueden ser: envases de alimentos/bebidas, recubrimientos de conservas, platos, tazas, platos de microondas, botellas de plástico, copas, latas, etc. Los plásticos producidos con BPA también tienen otras aplicaciones como son: la fabricación de CDs o DVDs, papel térmico, dispositivos médicos, gafas de sol, etc. (Vandenberg et al., 2007).

Los materiales que permanecen en contacto con los alimentos son un punto clave de fuente de contaminación, por lo que deben ser evaluados y regulados para su utilización. Por ello el BPA es un compuesto autorizado y regulado mediante el Reglamento de la Unión Europea (UE) 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. En esta directiva se establece que un límite de migración especifica (SML), es decir, la cantidad máxima de BPA permitida en

los alimentos que no conlleva un riesgo para la salud, siendo esta 0,6 mg/kg de alimento/día. (Reglamento 10/2011, 2011).

1.2 Exposición

El BPA tiene diferentes maneras de alcanzar el organismo, es decir, cuenta con diferentes vías de exposición: vía oral, vía inhalatoria y vía cutánea. Las fuentes más importantes de exposición al BPA son a través de: la dieta, el agua, el polvo, el contacto con papel térmico, materiales dentales, y dispositivos o aparatos utilizados en medicina (Geens et al., 2012).

Debido a la presencia en el medio ambiente de BPA, la población se encuentra expuesta al BPA de manera crónica y/o en las etapas más sensibles de la vida (Flint et al., 2012), pero se ha demostrado que la comida y más en concreto la comida en conserva o enlatada es la fuente de exposición de mayor importancia (Lorber et al., 2015).

Para el análisis de la exposición al BPA se han utilizado diferentes métodos y algunos estudios miden las concentraciones de BPA en los alimentos para observar la migración producida desde el envase al alimento y estimar la exposición del BPA en el organismo (Munguia-Lopez, 2005); otros estudios se centran en el análisis de los tejidos y fluidos corporales de individuos expuestos. El BPA en sangre, la concentración disminuye rápidamente tras la exposición, por ello se utiliza la orina como biomarcador principal para evaluar la exposición al BPA (Vandenberg et al., 2010). El BPA también ha sido detectado en el calostro, en el fluido folicular y amniótico, en el cordón umbilical, en el tejido placentario y en el hígado de fetos (Rochester, 2013).

En la última opinión científica publicada por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el 2015, se realizó una evaluación de la exposición dietética al BPA. Las concentraciones más alta de BPA se encontraron en los alimentos y productos envasados, en comparación con alimentos no envasados, donde la media muestra concentraciones fue de 18,68 µg/kg y 1,5 µg/kg de BPA respectivamente (Figura 2a) (EFSA, 2015).

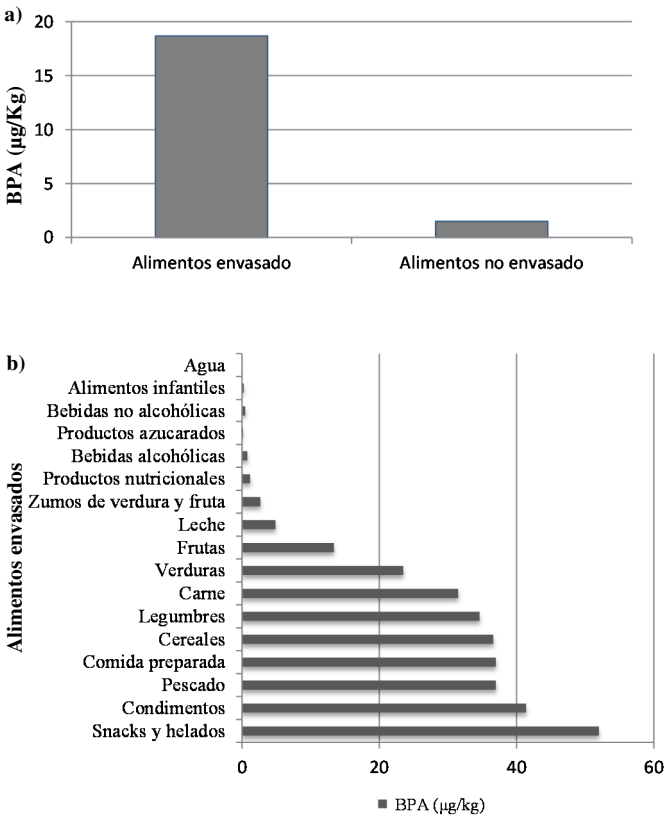


Figura 2. Presencia de BPA en productos envasados y no envasados (a); Grupos de alimentos envasados donde se observan las concentraciones más relevantes de BPA (b) (EFSA, 2015).

Las categorías de alimentos envasados donde se observaron las concentraciones más relevantes de BPA fueron cereales, legumbres, carnes, pescados, condimentos, comida preparada, snacks y helados. Estas 7 categorías alcanzan valores superiores a 30 µg/kg BPA (Figura 2b) (EFSA, 2015).

Entre los alimentos no envasados las concentraciones de BPA más altas aparecieron en carne y pescado, con valores de 9,4 µg/kg y 7,4 µg/kg de BPA respectivamente (Figura 2b).

También se realizó una estimación de la cantidad de BPA dietético en grupos de población de diferentes rangos de edad. Los resultados mostraron niveles de BPA más altos en bebes y en niños (EFSA, 2015). Los fetos, bebes y niños representan la población con más riesgo frente a la exposición del BPA, ya que, el proceso de desarrollo y crecimiento del organismo es más susceptible a los efectos del BPA y otros DE (Moya et al., 2004).

El valor de Ingesta Diaria tolerable (IDT) del BPA ha sido modificado en el último informe realizado por la EFSA en el 2015, y ha pasado de 50 µg/kg pc/día a 4 µg/kg pc/día (EFSA, 2015). En referencia al análisis de la exposición del BPA realizado por la EFSA, este concluye que la exposición dietética no supera el valor de IDT para ningún grupo de edad, ya que los niveles calculados se encuentran 3-4 veces por debajo del valor de IDT. También se hace referencia y se apunta que la evaluación del exposición de fuentes no dietéticas presenta cierta incertidumbre y debe ser estudiada (EFSA, 2015)

1.3 Metabolismo y mecanismo de acción

Cuando el BPA alcanza por vía oral el organismo, se metaboliza en el hígado con mucha rapidez, convirtiéndose en un metabolito muy soluble: BPA-glucuronido (BPA-GLU) (Völkel et al., 2002). Una cantidad más pequeña de BPA, reacciona con sulfato dando lugar a BPA-Sulfato (Geens et al., 2012). La conjugación del BPA se considera un proceso de desintoxicación (Matthews et al., 2001), ya que este, se elimina de manera eficiente por la orina. Tras la exposición oral, el BPA libre es muy poco biodisponible, lo que demuestra la eficacia del primer paso hepático del metabolismo del BPA (EFSA, 2008).

El BPA conjugado no presenta actividad estrogénica, por lo que cuando el BPA es metabolizado, sólo una pequeña cantidad de BPA libre puede unirse a los receptores estrogénicos (ER) produciendo la alteración hormonal y los consiguientes efectos adversos (Mileva et al., 2014).

El mecanismo de acción del BPA varía, según la dosis, el tejido y la etapa de exposición (Vom Saal et al., 2007). Como se ha comentado, el BPA es un compuesto que tiene la capacidad de imitar las acciones de los estrógenos, y algunos estudios recientes han relevado que el BPA es un potente estrógeno sintético, ya que tiene la capacidad de alterar las respuestas celulares en diferentes tejidos y mediante diferentes mecanismos de acción y a dosis muy bajas, al unirse a los ER con gran afinidad (Alonso-Magdalena et al., 2012).

1.4 Efectos sobre la salud

Diversos estudios realizados con humanos han relacionado la exposición al BPA con la aparición de efectos adversos para la salud (Rochester, 2013). También se ha realizado estudios *in vivo* e *in vitro* donde se han evaluado los efectos del BPA (Vandenberg et al., 2013).

En este apartado se presentaran de manera general, los efectos tóxicos más destacables que han sido relacionados con el BPA en los estudios más recientes (Tabla 1) (Rochester, 2013).

1.5 Antecedentes

En los últimos años el BPA ha sido objeto de discusión. Los estudios y la preocupación por sus efectos sobre la salud han crecido considerablemente, convirtiendo al BPA en un protagonista en la prensa, de muchas publicaciones científicas y de opiniones científicas de las autoridades competentes.

Tabla 1: Efectos tóxicos relacionados con BPA.

REPRODUCCIÓN	➢ Fertilidad ➢ Función sexual masculina ➢ Reducción calidad espermatozoides ➢ Concentración de hormonas sexuales ➢ Síndrome de ovario poliquístico ➢ Alteraciones del endometrio ➢ Cáncer de mama ➢ Aborto involuntario ➢ Nacimiento prematuro
DESAROLLO	➢ Peso de nacimiento ➢ Anormalidades en los genitales masculinos ➢ Anormalidades en comportamiento/neurodesarrollo en la infancia ➢ Asma y problemas respiratorios en la infancia
METABOLISMO	➢ Diabetes tipo 2 ➢ Alteraciones cardiovasculares, hipertensión y niveles de colesterol. ➢ Función del hígado ➢ Obesidad
OTROS	➢ Función tiroidea ➢ Función inmunológica ➢ Albuminuria ➢ Estrés oxidativo e inflamación ➢ Expresión genética

La EFSA ha realizado diferentes estudios y ha emitido un total de 4 opiniones científicas sobre el riesgo para la salud de los consumidores respecto al BPA en los años: 2006, 2008, 2010 y 2015. Las publicaciones realizadas por el organismo competente han sufrido modificaciones que a continuación se exponen.

En 2006 la EFSA realizó una caracterización del riesgo del BPA, donde incluyó una evaluación de la exposición a través de la dieta del BPA. Se estableció, entonces, un valor de 0,05 mg BPA/kg pc/día como IDT (EFSA, 2006). En 2008 la EFSA realizó una valoración de la toxicocinética del BPA, en está, se se afirmó que las diferencias dependientes de la edad en la toxicocinética observadas en animales y humanos tras la exposición al BPA no afectan al valor establecido como IDT en el 2006, reafirmando así el valor propuesto (EFSA, 2008)

En 2010, se recogieron todos los resultados de los estudiados realizados y se volvió a evaluar el riesgo y peligro del BPA. En la opinión de 2010 se concluyó que los nuevos estudios examinados no aportan ninguna evidencia científica que planteara cambiar el valor de IDT establecido. Sin embargo, se contemplaron en algunos estudios con animales, y los efectos del BPA presentaban cierta incertidumbre, previamente no observada, y podrían tener relevancia toxicológica. En estos estudios se observaron algunos errores en su metodología de su realización por lo que la EFSA concluyó que los resultados obtenidos no habían sido evaluados en humanos y por tanto no se podían extraer conclusiones relevantes, pero que se debería de reconsiderar una nueva evaluación con nuevos datos disponibles (EFSA, 2010).

En 2011, la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (ANSES) publicó una opinión científica sobre el peligro del BPA, que presentaba notables diferencias respecto a la opinión de la EFSA del 2010. En este informe francés, se hacía hincapié a los peligros potenciales que presenta el BPA y a la necesidad de reducir su exposición.

Tras esto, la EFSA consideró necesario realizar una reevaluación más profunda del BPA y sus posibles riesgos (EFSA, 2011). Los datos más recientes en relación al BPA se han publicado a lo largo de este año, 2015 (EFSA, 2015), por lo que la publicación de la EFSA (EFSA, 2015) contiene una evaluación de la exposición más exhaustiva ya que, a diferencia de los trabajos realizados con anterioridad, se ha tenido en cuenta la evaluación de la exposición a BPA de fuentes no dietéticas (EFSA, 2015).

Otra novedad respecto a los informes anteriores, ha sido el planteamiento de un nuevo valor temporal de IDT, pasando a ser 4 µg/kg pc/día. En este informe se concluye, que "el BPA no presenta riesgos para la salud de los expuestos" sin embargo, se hace hincapié en la necesidad de evaluar de manera más detallada la exposición de fuentes no dietéticas (EFSA, 2015).

1.6 Legislación y situación actual

Actualmente, en la UE el BPA se considera un producto autorizado para la utilización como material destinado a entrar en contacto con los alimentos (Reglamento UE 10/2011, 2011). En el caso de su utilización como material destinado a formar parte de los biberones de plástico para lactantes, el uso de BPA fue prohibido en 2011 (Reglamento 321/2011, 2011). Esta restricción se aplicó a partir del 1 de mayo de 2011 en relación con su fabricación y a partir del 1 de junio de 2011 respecto a su comercialización e importación en la UE (Reglamento UE 321/2011, 2011).

En referencia a el aspecto legislativo en España, se ha modificado el Anexo II del Real Decreto 866/2008 (RD, 2008), por el cual se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos de plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo, mediante la Orden PRE/628/2011 (2011). Esta modificación se basa en la inclusión en la normativa en referencia al BPA de: "no utilizar en la fabricación de biberones de policarbonato para lactantes" (RD 866/2008, 2008).

Por otra parte, es interesante señalar la regulación específica que sigue Francia, bajo la Ley nº 2012-1442, (2012) en la que el queda suspendida la fabricación, importación, exportación y comercialización de cualquier envase de alimentos que contenga BPA (Loi Nº 2012-1442, 2012).

En la última publicación realizada por la EFSA en el 2015, se concluye que "los niveles estimados de exposición dietética y de exposición agregada (dietética y no dietética) del BPA, en relación con la población con más riesgo de exposición (bebes, niños y adolescentes) es menor al IDT establecido (4 µg/kg pc/ día)". Se señala también, que el valor es temporal, ya que se espera analizar los resultados que se obtengan de nuevos estudios relativos a los efectos en las glándulas mamarias, en la reproducción, en el comportamiento neuronal, y a nivel inmunológico y metabólico, principalmente debido a las inquietudes de posibles diferencias en los efectos obtenidos entre especies.

Es importante tener en cuenta que en el informe de la EFSA se afirma que, "existen algunas incertidumbres que deben ser evaluadas y estudiadas en referencia a la evaluación de la exposición del BPA de fuentes no dietéticas, como son la exposición a través del papel térmico, cosméticos y polvo" como se ha señalado anteriormente (EFSA, 2015). Se espera dar respuesta a algunas de estas cuestiones mediante la investigación que está llevando a cabo el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos (NTP) en un futuro próximo.

De este modo, en la situación actual, y respecto a las directrices establecidas y opiniones científicas recientes, se podría afirmar que para los niveles estimados de exposición del BPA, no existe ninguna preocupación para la salud en ningún grupo de edad.

En esta revisión se pretende recoger los estudios *in vivo* e *in vitro* que se han llevado a cabo en los últimos años, poniendo de manifiesto los

efectos que produce el BPA, debido principalmente a mecanismos de acción que puede seguir el BPA en el organismo y efectos potenciales sobre la salud humana que puede provocar la exposición a BPA.

Material y métodos

Para la realización de la presente revisión bibliografía se han consultado diferentes fuentes, textos y documentos de carácter científico utilizando distintos criterios de búsqueda. Se han consultado artículos científicos, revisiones sistemáticas, bases de datos y documentos de carácter legislativo. Las principales bases de datos utilizadas han sido: PubMed, Scopus, y Web of Science para la identificación de estudios y artículos para esta revisión.

Se realizó una búsqueda general, para conocer aspectos básicos y generales del BPA, mediante la utilización de las siguientes palabras clave: "bisphenol A, bisphenol A and health, toxicity of bisphenol A, bisphenol A in food". Posteriormente, la búsqueda se centró en aquellos artículos más recientes, en los que se valorarán efectos y consecuencias tras la exposición al BPA mediante la utilización de sistemas celulares y modelos animales. Se clasificaron los artículos en estudios "*in vivo*" e "*in vitro*", así como aquellos epidemiológicos realizados con humanos, y de biomonotorización. En cuanto al aspecto legislativo del BPA, se han consultado los diferentes reglamentos y las modificaciones que estas han surgido en los últimos años.

Resultados y discusión

3.1 Estudios toxicidad del BPA "in vitro"

En la Tabla 2 se recogen los estudios más recientes relacionados los efectos adversos tras la exposición de distintas líneas celulares a diferentes dosis de BPA. Los estudios se han agrupado en 7 categorías, según el efecto, es decir, el sistema o actividad que ha sido alterada como consecuencia de la exposición al BPA. Las categorías han sido:

1. Proliferación celular y cáncer.
2. Alteraciones en el desarrollo y maduración celular.
3. Estrés oxidativo y daño en el material genético.
4. Afectación a nivel metabólico.
5. Afectación sistema reproductivo.
6. Afectación sistema cardiovascular.
7. Afectación sistema neuronal.

3.2 Estudios toxicidad del BPA "In vivo"

En la Tabla 3 se recogen los estudios más recientes en relación con los efectos adversos consecuentes a la exposición, a diferentes dosis de BPA en modelos animales. Se ha dividido en diferentes categorías, siguiendo la misma estructura que en la recopilación de estudios *in vitro* (sección 3.1).

3.3 Toxicidad del BPA

En los últimos años, se han estudiado diferentes efectos que tienen lugar bajo la exposición del BPA *in vitro* e *in vivo*. Las tablas 2 y 3, contienen artículos de las categorías, mencionada anteriormente.

Aunque los estudios se han clasificado según las diferentes categorías, el desarrollo y comentario de los mismos se va a realizar centrándose en los estudios *in vitro* (Tabla 2) y posteriormente en los estudios *in vivo* (Tabla 3).

Son muchos los estudios que relacionan la exposición al BPA con distintos tipos de cáncer. El BPA cuenta con diferentes mecanismos por los cuales induce la aparición de carcinomas. Por una parte, el BPA promueve la sobreexpresión o la inhibición de determinados genes, proteínas reguladoras de los procesos apoptóticos o factores determinantes del crecimiento celular provocando el crecimiento de tumores y el desarrollo de cáncer (Hussain et al., 2015, Bhan et al., 2014, Ptak et al., 2013 y 2015). Por otra parte, el BPA también tiene la capacidad de facilitar el proceso de migración e invasión celular, y así promover la metástasis del cáncer (Ma et al, 2015).

El BPA aumenta la expresión del gen HOXC6 a concentraciones muy bajas (0'1-1000 nM) en distintas líneas celulares: MCF7 (adenocarcinoma mamario sensible a receptores estrogénicos) y T47D (carcinoma ductal mamario sensible a receptores estrogénicos). También se incrementan los valores de expresión del gen en ratones *Sprague Dawley* cuando se les administra 25 μg/kg pc de BPA. La sobreexpresión del gen HOXC6 se utiliza como indicador de distintos tipos de cáncer de mama, ya que se ha visto que el aumento de los niveles de expresión, inducen el crecimiento de factores tumorales y facilita la formación de colonias, indicando un riesgo potencial en el crecimiento de un tumor en las glándulas mamarias. La relación del BPA con el aumento de la expresión del gen HOXC6 se ha observado en líneas celulares sensibles a los receptores de estrógenos, mientras que en cultivos celulares de adenocarcinoma mamario negativos para receptores de estrógenos (MDA-MB-231), los efectos del BPA no muestran el mismo. Esto se traduce, a que el BPA aparentemente tiene actividad carcinógena debido a sus propiedades estrogénicas (Hussain et al., 2015).

Bhan y col. (2014) han reforzado la hipótesis planteada anteriormente, en referencia a que la relación entre BPA y cáncer, se debe principalmente a la capacidad del BPA en actuar como un estrógeno sintético sobre los receptores estrogénicos del organismo, modulando la expresión de determinados genes o proteínas. En este caso, se ha comprobado que el BPA, también a concentraciones nanomolares (100 nM) aumenta la expresión del gen HOTAIR en células de cáncer de pecho positivas a los receptores de estrógeno (MCF7) y en glándulas mamarias de ratones *Sprague Dawley* cuando se les administra 25 μg/kg pc. El gen HOTAIR es un gen que se encuentra sobreexpresado en los tejidos con cáncer de mama y que también, sus niveles de expresión están inducidos por la exposición al BPA.

Además de la alteración de los niveles de expresión de los genes anteriormente descritos (HOXC6, HOTAIR) el BPA inhibe la expresión del gen Caspasa3 a concentraciones por debajo a las utilizadas en los otros estudios (40 nM). Se ha visto en líneas celulares de cáncer de ovario (OVCAR3) que la exposición al BPA, inhibe los niveles de expresión genética y proteica de Caspasa3. Las caspasas son moléculas encargadas de mediar procesos apoptóticos, por lo que alteraciones en sus niveles, alteran el proceso de muerte celular programa y promueven el desarrollo de tumores (Ptak et al., 2013).

La migración e invasión celular son procesos determinantes en el desarrollo y crecimiento del cáncer, se ha visto que el BPA está implicado en la inducción de estos procesos. A concentraciones de 10^{-6} M de BPA se promueve la expresión de fibronectina (FN) y metaloproteinasa 9 (MMP9) en líneas celulares de cáncer cervical (HeLa, SiHa y C-33). El aumento de los niveles de estos dos compuestos, se traduce con el aumento de proteínas implicadas en la migración de células cervicales cancerosas. Además, el BPA a 10^{-8} M disminuye la concentración de BAY11-7082 (inhibidor de NF-kB), una regulación defectuosa de NF-kB se relaciona con distintas enfermedades, entre ellas, el cáncer. Por lo que el BPA estimula la migración, movilidad e invasión de la células cervicales cancerosas, es decir, la metástasis del tumor, mediante NF-K β, FN y MMP9 (Ma et al, 2015).

Yang y col. (2013) también han investigado la relación del BPA y la proliferación de células tumorales durante la mamogénesis. Se ha visto que el BPA a las mismas concentraciones que promueven el aumento de proteínas implicadas en la migración de células tumorales ($1x10^{-6}$ M), disminuye los niveles de proteínas E-cadherina en células madres embrionarias humanas (X-01). Las cadherinas son moléculas implicadas en la adhesión celular y se han relacionado con la metástasis de diversos tumores. Además se ha visto que la exposición

a BPA también aumenta la expresión del OCT4 y proteínas NANONG. Estas dos moléculas se han detectado en concentraciones superiores en células madre cancerígenas; por lo que la exposición a bajas dosis de BPA durante el proceso de diferenciación celular o formación de células mamarias epiteliales, altera la expresión de marcadores moleculares y aumenta la sensibilidad o el riesgo a padecer cáncer de mama.

Los tumores malignos estimulan la formación de vasos sanguíneos mediante la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína encargada del desarrollo de capilares sanguíneos. El BPA tiene un efecto estimulante en la expresión y secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y en su receptor (VEGF-R) a concentraciones nanomolares (1, 40 y 100 nM) en células ováricas cancerosas (SKOV-3 y OVCAR-3), pero no en células humanas no cancerosas (HOSEpiC), por lo que el BPA favorece el proceso de crecimiento y adaptación al organismo de los tumores (Ptak et al., 2015).

El peligro o la potencialidad de los efectos adversos para la salud de la mayoría de los disruptores endocrinos, incluyendo el BPA, se han visto cuando la exposición tiene lugar en estadios tempranos de la vida, alterando los procesos de desarrollo, maduración y/o diferenciación celular. De ahí la importancia de centrar los efectos del BPA cuando la exposición tiene lugar en los primeros estadios de desarrollo del feto o enprimeros estadios de embarazo.

El BPA es capaz de alterar el desarrollo de la placenta y consecuentemente promover complicaciones del embarazo y del feto. El trofloblasto, y más en concreto el sincitiotrofoblasto, son capas de las placenta encargadas de producir números factores de crecimiento, hormonas y enzimas importantes para el desarrollo del feto. Se ha visto que el BPA en concentraciones de 0,1 - 2 μg/mL en células primarias del trofloblasto aumenta los niveles de proteínas y de actividad de 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD2), compuesto clave para el correcto desarrollo y la maduración del feto.

Tabla 2: Estudios de toxicidad "in vitro" de BPA

CÉLULAS	DOSIS TIEMPO	OBJETIVO	MÉTODO/ENSAYO	EFECTO/RESULTADOS	REFERENCIA
MCF7 T47D MDA-MB-231	* 0'1, 1, 10, 100, 1000 nM * 15 minutos, 30 minutos y 1, 2,4 6 h. * E2 0'01, 0'1, 1,10, 100 nM	Evaluación de la expresión de HOXC6	a) Q-PCR: expresión de HOXC6. b) ChIP: ensayo de inmunoprecipitación de cromatina para determinar los enlaces de ER y MLL al promotor de HOXC6. c) Ensayo de formación de colonias 3D.	a) Tratamiento con BPA, ↑ expresión de HOXC6 en MCF7 y T47D y ↓ en MDA-MB-231, es decir, es ↑ la expresión en ER positivo y no en ER negativo (cáncer positivo o negativo para receptores de estrógenos). Tratamiento con E2 + BPA ↑ expresión de HOXC6 en MCF7 y T47D y ↓ en MDA-MB-231, es decir, es ↑ la expresión en ER positivo y no en ER negativo. b) BPA y E2 modulan el reclutamiento de ERα y reguladores de ER (MLL) y promueven la modificación de histonas en los promotores de HOXC6. c) El aumento de la expresión de HOXC6 induce el crecimiento de tumores y facilita la formación de colonias 3D.	Hussain et al., 2015
MCF7	* 100 nM * 4 H * E2 0'1 nM	Evaluación de la expresión de HOTAIR	a) Q-PCR para determinar la expresión del gen HOTAIR. b) Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina. c) Doble sistema de ensayo indicador de luciferasa para determinar actividad transcripcional.	a) BPA ↑ la expresión del gen HOTAIR. Cuando se trata con BPA y E2 se produce una disminución de la inducción. b) En presencia de BPA, los ERs y sus reguladores como MLL1 y MLL3 se unen a EREs, modificando la cromatina y provocando la activación del gen. c) EREs están inducidos por BPA.	Bhan et al., 2014
OVCAR3	* 40 nM * 3, 6 y 24 h * Leptina 2'5 nM	Determinar la expresión y actividad de la caspasa 3.	a) Q-PCR para medir la expresión genética de caspasa 3, survivin ,JAK/STAT, MAPK/ERK1/2, y PI3K/Akt. b) Western blot para medir la expresión proteica de caspasa 3 y survivin. c) Ensayo de Fluorometría para medir la actividad de caspasa 3.	a) BPA inhibe la caspasa 3 actuando sobre ERK1/2 y la leptina actuando sobre STAT3. b) BPA + Leptina ↓ la expresión proteica de caspasa 3. La proteína survivin no se ve afectada. c) BPA + Leptina inhiben la actividad de caspasa 3.	Ptak et al., 2013.

HeLa SiHa C-33ª	* 10^{-6}- 10^{-9} M * 24, 48 y 72 h	Estudiar la migración de células cervicales cancerosas.	a) Ensayo Wound healing (migración celular). b) Western blot para determinar proteínas relacionadas con la migración celular: FN y MMP-9 y niveles de NF-K β, BAY 11-7082. c) Doble sistema de ensayo indicador de lucifera para determinar la actividad transcripcional.	a) y b) 10^{-9} M de BPA promueve la invasión y la migración celular. b) 10 $^{-}$8 M de BPA ↑ la expresión de proteínas FN y MMP de manera dependiente del tiempo. BPA ↓ BAY 11-7082 (inhibidor de NF-KB). c) BPA ↑ fosforilación de IkBα y p65 → ↑ actividad de NF-K β.	Ma et al., 2015.
X-01	* 1x10^{-6} - 1x10^{-9} M * 10 días * E2 10^{-9} M	Estudio de la diferenciación y formación de las células epiteliales mamarias.	a) Medición de marcadores moleculares de células pluripotentes mamarias epiteliales mediante: Microscopio confocal, y de transmisión junto a ensayo de Western Blot.	a) BPA promueve el crecimiento de las células de la glándula mamaria. BPA → ↓ expresión proteína E-cadherin. BPA + E2 → ↑ área celular de la glándula mamaria, ↑ expresión proteica de Oct 4, ↑ expresión proteínas Nanong.	Yang et al., 2013
HOSEpiC SKOV-3 OVCAR-3	* 1,40,100 nM * 3- 48 h * E2 0'1, 10, 20 nM	Determinar expresión de VEGF-R2 y VEGF-A.	a) Q-PCR para medir la expresión genética de VEGF-R2 ,VEGF-A y ERα ERβ. b) Western blot para medir la expresión proteica de VEGF-R2,VEGF-A y ERα ERβ. c) Ensayo colorimétrico para medir niveles de VEGF-A.	a) b) y c) La expresión de ERβ es similar en las dos líneas celulares, pero ERα es mayor en SKOV-3. BPA + E2 → ↑ VEGF-R2 en células no cancerosas y no afecta a VEGF-A. BPA → ↑ Expresión y secreción de VEGF-R2 y VEGF-A en células cancerosas.	Ptak et al., 2015.
Células primarias del trofoblasto	* 0'1, 0'25, 0'5, 1, 2 μg/ml * 24 h	Estudiar la expresión de los genes que codifican las hormonas y factores precedentes a la placenta. También se va a medir mRNA de otros factores y hormonas destacadas.	a) AlamarBlue-Cell Viability Reagent (morfología y viabilidad celular) b) Ensayo estándar radiométrico mide la actividad de 11β-HSD2. c) Western blot, para medir los niveles de 11β-HSD2, aromatasa y CRH. d) Q-PCR para medir iveles de 11β-HSD2 mRNA, leptina mRNA. e) Inmunoensayo por microparticula para determinar la concentración de hCG.	a) BPA no afecta a la viabilidad ni a la morfología de la célula. b) BPA↑ niveles de actividad de 11β-HSD2. c) BPA ↑ niveles de proteína 11β-HSD2 ,↑ niveles de aromatasa y ↑ CRH. d) BPA ↑ niveles de 11β-HSD2 mRNA y ↓ leptina mRNA. e) El BPA ↑ niveles hCG.	Rajakumar et al., 2015.
N2A SK-N-AS 3T3-L1	* >10 μM * 48 y 72 h	Determinar la metilación del ADN y la diferenciación de adipocitos.	a) HPLC y PCR b) Citometría de flujo para cuantificar la diferenciación mediante los porcentajes de adipocitos en 3T3-L1.	a) En células N2A: a 10 μM de BPA, ↓ metilación ADN. En células 3T3-L1: a 50 μM de BPA↑ metilación de ADN. b) ↑ Diferenciación de adipocitos cuando la concentración de BPA es 50 μM.	Sales et al., 2013.

Células endometriales estromales Células de la placenta	* 1 nM * 24 y 48 h * 0'5 nM * 24 y 48 h	Estudio del endometrio.	a) Determinación de concentración de la hormona gonadotropina coriónica y el factor inhibidor de la migración de macrófagos mediante un ensayo inmunoenzimático. b) GC- MS para la determinación del BPA.	a) El BPA estimula la liberación de la hormona gonadotropina coriónica y el factor inhibidor de la migración de macrófagos. Este efecto es menor en las células de la placenta. b) Las células endometriales retienen BPA.	Mannelli et al., 2015.
$Ku70^{+/+}$ $Ku70^{-/-}$	* 150 μM * 1 y 24 h	Analizar la reparación por escisión de bases en ADN dañado por oxidación inducida.	a) CM-H2 DCFDA (niveles de ROS). b) GC-MS para identificar y cuantificar las bases del ADN modificadas. c) Inmunofluorescencia.	a) BPA ↑ ROS. b) BPA + KBrO3 ↑ lesiones oxidativas del ADN. BPA + KBrO3 ↓ la señalización de la hebra rota. c) BPA suprime la reparación de las lesiones inducidas por KBrO3 y los intermediarios de reparación. BPA ↓ el reclutamiento de XRCC1 y la acumulación de PAR se redujo.	Gassman et al., 2012.
Linfocitos periféricos bovinos	* $1x10^{-4}$ - $1x10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ * 48 h	Efectos genotóxicos y citotóxicos.	a) Cuantificación de micronúcleos. b) Cálculo del índice de división nuclear (IDN).	a) ↑ número micronucleos cuando la concentración de BPA es $1x10^{-4}$ $mol.L^{-1}$. b) BPA no afecta al IDN a ninguna concentración.	Sutiaková et la., 2014.
FRTL-5	* 10^{-4} – 10^{-9} M * 1 y 3 días	Estudio de la expresión de genes involucrados en la síntesis y transcripción de hormonas tiroideas.	a) Ensayo MTT (viabilidad celular). b) Q-PCR para determinar la expresión de tiroglobulina, factores de transcripción del tiroides (Pax8, Nkx2-2 y Foxe 1), NIS, TSH-receptor, peroxidasa tiroidea (TPO).	a) No hay alteración de la viabilidad celular a ninguna concentración de BPA estudiada. b) BPA 10^{-4} M durante 1 día:↑ los niveles de transcripción de tiroglobulina, Pax8, Nkx2-2 y Foxe 1. BPA 10^{-9} M y 10^{-8} M durante 1 día: ↑ niveles de expresión de NIS, TSH-receptor y TPO. BPA 10^{-4} M durante 1 día: ↑ NIS, TSH-receptor. Cuando la exposición es de 3 días solo se altera el nivel de tiroglobulina para todas las concentraciones.	Gentilcore et al., 2013
Tejido adiposo humano: *de mama *subcutáneo abdominal *subcutáneo de individuos con obesidad mórbida.	* 0'1, 1, 10, 100 nM * 6 h * E2 0'1, 1, 10, 100 nM	Determinar la secreción de la adiponectina en el tejido adiposo y los efectos en la maduración de adipocitos aislados.	a) Ensayo de inmunoabsorbancia por ELISA para determinar los niveles de adiponectina. b) Q-PCR para determinar niveles de expresión de ERα, ERβ, GPR30, ERRα, ERRβ, y ERRγ en el tejido adiposo.	a) BPA (0,1 y 1 nM) suprime la liberación de adiponectina en todos los tejidos adiposos. E2 es menos efectivo que el BPA en esta supresión a las mismas concentraciones que el BPA. b) BPA es más efectivo que E2. GPR30,ERRα y ERRβ ↓ su expresión Los niveles de mRNA de ERα, Erβ y ERRγ son similiares en el grupo control y expuestos pero los niveles de GPR30, ERRα, ERRβ son mucho más inferiores en expuestos a BPA.	Hugo et al., 2008.
Espermatozoides de toros	* 1, 10, 100, 200 μg mL^{-1} * 6 y 24 h	Determinar la movilidad, viabilidad y producción de radicales superóxido en espermatozoides.	a) CASA System (movilidad). b) Ensayo MTT (viabilidad celular). c) Test NBT (radicales superóxido).	a) Movilidad ↓ en concetraciones > 100 μg mL^{-1} a las 24 h. b) Viabilidad decrece en todos los ensayos, pero esto es mayor cuando la concentración de BPA es de 200 μg mL^{-1} durante 24 h. c) Cantidad de radical superóxido ↑ en todas los experimentos, pero es estadísticamente significativo cuando la concentración es > 100 μg mL^{-1} BPA	Lucacova et al., 2015.

Miocitos ventriculares de ratones *Sprague-Dawley* hembras y machos.	* 10^{-9} y 2x10 $^{-9}$M * 2-7 minutos * E2 10^{-9} y 2x10 $^{-9}$ M	Estudio del efecto arritmogénico y mecanismo celular de los estrógenos.	a) Electrocardiograma para determinar el efecto arritmogénico. b) Análisis del tránsito de Ca^{2+} en miocitos.	a) BPA 10^{-9} M desencadena arritmias. BPA + E2 → ↑ efectos. Una estimulación de catecolamina, BPA y E2 provocan arritmias en corazones de ratones hembras, pero no en machos. b) BPA y E2 alteran el transporte de calcio: ↑ el retículo sarcoplasmático, ↑ concentración de Ca^{+2} en el retículo sarcoplasmático.	Yan et., 2011.

MCF7: Línea celular con adenocarcinoma mamario, positiva para los receptores estrogénicos **T47D:** Línea celular con carcinoma ductal mamario, positiva para los receptores estrogénicos **MDA-MB-231:** Línea celular con adenocarcinoma de las células mamarias, negativa para los receptores estrogénicos **E2:** Estradiol **Q-PCR:** Método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real **ChIP:** Ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina **Erα / Erβ:** Tipos de receptores de estrógenos **MLL:** Metilasa de histonas **MLL1:** Histona metiltransferasa 1 **MLL3:** Histona metiltransferasa 3 **OVCAR3:** Línea celular carcinoma ovario **JAK/STAT:** Vía de señalización intracelular **MAPK/ERK:** Ruta de proteínas quinasas activadas por mitógenos **PI3K/Akt**: Vía de señalización fosfatidilinositol 3-kinasa **STAT3:** Factor de transcripción **HeLa, SiHa y C-33ª:** Líneas celulares con carcinoma cervical **FN:** Fibronectina **MMP-9:** Matriz metaloproteinasa 9 **NF-Kβ:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β **BAY 11-7082:** Factor inhibidor de NF-Kβ **IkBα:** Factor inhibidor de NF-Kβ **p65:** Factor de transcripción **X-01:** Línea celular de células madre embrionarias humanas **HOSEpiC:** Línea celular de células humanas no cancerosas **SKOV-3:** Línea celular carcinoma ovario **VEGF-R2:** Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2 **VEGF-A:** Factor de crecimiento vascular endotelial A **mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero **11β-HSD2**: Corticosteroides isoenzima 11-β-deshidrogenasa 2 **hCG:** Hormona gonadotropina corionica humana **CRH:** Hormona liberadora de corticotropina **N2A:** Células del neuroblasto de ratones Murinae **SK-N-AS:** Células del neuroblastoma humanas **3T3-L1:** Fibriblastos preadipocito de ratones Murinae **ADN:** Ácido desoxirribonucleico **HPLC:** Cromatografía liquida de alta eficacia **AP-PCR**: Técnica PCR con oligonucleótidos arbitrarios **GC- MS**: Cromatografía

Tabla 3: Estudios de toxicidad "in vivo" de BPA

CÉLULAS	DOSIS TIEMPO VIA DE ADMINISTRACIÓN	OBJETIVO	MÉTODO/ENSAYO	EFECTO/RESULTADOS	REFERENCIA
Glándulas mamarias de ratones Sprague-Dawley (hembra)	* 25 µg/kg pc * DES 5 µg/kg pc * Estradiol 5 µg * 28 H * Inyección	El BPA en la expresión del gen HOTAIR	a) Q-PCR	a) BPA y DES inducen la expresión de el gen HOTAIR. BPA + DES + Estradiol: disminución de la inducción de la expresión de HOTAIR.	Bhan et al., 2014
Ratones Sprague Dawley (hembras)	* 25 µg/kg pc/día * Estradiol 5 µg/kg pc/día * 24 h * Inyección	El BPA en la expresión del gen HOXC6.	a) Q-PCR para medir la expresión del gen HOXC6. b) Western blot para medir los niveles de proteínas relacionados con el gen HOXC6.	a) y b) Estradiol ↑ la expresión de HOXC6 BPA ↑ expresión del gen HOXC6 BPA + Estradiol ↑ expresión del gen HOXC6	Hussain et al., 2015
Ratones BALB/cA (1) Ratones no diabéticos NOD/ShiLtJ (2) Embriones de pollo spp Gallus gallus (3)	*(1) 10, 100 mg/L (2) 0.1, 1, 10 mg/L (3) 0.23 mg/kg * 12 meses * Oral	Estudio del neurodesarrollo del cerebelo.	a) Inmunotinción. b) Western blot.	a) BPA induce un aumento en el espesor de la parte externa de la capa de gránulos en las tres especies analizadas. b) BPA ↑ el nivel total de el gen Pax6 a los 11 días de vida de los ratones descendientes. El nivel de Pax6 también aumenta en el cultivo de gránulos del cerebelo en el día 6 , en los embriones de pollo.	Mathisen et al., 2013
Ratones Adultos (hembra)	* 0'5, 50 mg/kg pc/día * 21 días * Inyección	Analizar el tejido hepático dañado.	a) Microscopio de alta resolución para examinar el tejido del hígado. b) Espectrofotometría para medir la actividad de los enzimas antioxidante (SOD, CAT, GPX).	a) Degeneración vacuolar en los hepatocitos, ampliación de las sinusoides sanguíneas, hepatocitos hinchados, necrosis hepatocitica y aparición de núcleos picnoticos. b) ↓ Actividad de CAT, SOD y GPX.	Eid et al., 2015

			c) Niveles de biomarcadores de estrés (MDA y NO). d) Capacidad antioxidante total (Koracevic et al., 2001) e) Daño en DNA: SCGE.	c) ↑ MDA y NO. d) La capacidad antioxidante totaldisminuye. e) mayor rotura de las cadenas de ADN induciend una mayor migración del ADN fuera del núcleo del tejido hepático.	
Ratones C57BL/6J (hembra)	* 3000 mg/kg pc/día * 5 semanas * Oral	Estudio de cambios en la metilación del ADN en el hígado.	a) HPLC : metilación del ADN total. b) Análisis del genoma completo.	a) El análisis global de la metilación del ADN no muestra ningún cambio entre expuestos y grupos control. b) No hay diferencias entre el grupo control y los expuestos.	Van Esterik et al., 2015
Ratones C57BL/6J (hembras y machos)	* 0-3000 µg/kg pc/día * 4 semanas y 6 días * Oral	Perfil metabólico en descendientes expuestos durante la gestación y la lactancia.	a) Test de tolerancia a la glucosa. b) Examen de la actividad locomotora. c) Examen histopatológico para cuantificar el tejido adiposo blanco (TAB) y marrón (TAM), y calcular el número de adipocitos. d) Análisis químico de plasma para medir niveles de colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad, ácidos grasos libres, adiponectina, grelina, leptina, glucagón, insulina, péptido pancreático (PYY-36). e) GC-MS: cuantificar el BPA de los expuestos a >300 µg/kg pc/día. f) Q-PCR, se va a medir la expresión de los genes ucp1. g) Medición peso corporal y peso hígado.	a) No hay diferencias entre el grupo de descendientes-control y los descendientes-expuestos. b) ↑Actividad física en el grupo de descendientes-expuesto hembras y ↓ en machos. c) TAB ↓ en descendientes-expuestos hembras. TAM ↑ en descendientes-expuestos machos y ↓ en hembras. El número de adipocitos no refleja diferencias en sexo, ni entre grupo control y expuestos. d) En descendientes-expuestos machos ↓ glucagón- En descendientes-expuestos hembras ↓ ácidos grasos libres, triglicéridos, adiponectnina y leptina. e) Concentraciones > 300 µg/kg pc/día: valores de 83-240 ng/ mL suero de BPA Concentraciones de 300 µg/kg pc/día: valores de 24-26 ng/ mL suero de BPA f) ↑ucp1 conforme ↑ la dosis de BPA en descendientes hembras. g) En descendientes-expuestos ↑ peso corporal y peso del hígado.	Van Esterik et al., 2014
Ratones CD1 (machos)	* 0-5000 µg/kg pc/día * 8 meses * Oral	Analizar marcadores hepáticos y de plasma relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos.	a) Monitorización del peso corporal, del peso del hígado, y del TAB. b) Análisis parámetros bioquímicos en plasma. c) Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.	a) No hay diferencias entre los expuestos y el grupo control en cuanto al peso corporal y hepático, pero en los expuestos ↑ TAB. b) ↑ Glucosa, colesterol total, HDL y LDL en expuestos. La insulina, ASAT y ALAT no presentan ninguna alteración. c) ↓ Tolerancia a la glucosa en los expuestos a 5000 µg/kg pc/día de BPA.	Marmugi et al., 2014

			d) Q- PCR: Cuantificación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, colesterol e hidratos de carbono. e) CG: contenido de lípidos en el hígado	d) Metabolismo HDC: ↓ glucoquinasa y piruvato quinasa, en expuestos. Metabolismo lipídico: aumento del ácido graso sintasa, gen SPOT14 sensible a la hormona tiroidea, estearoil coenzima A desaturasa, y fosfolipasa-patatina 3. Metabolismo colesterol: incremento de la expresión genes que participan en la síntesis de colesterol: HMG-coenzima A reductasa, mevalonato disfosfato descarboxilasa, escualeno epoxidasa, lanosterol sintasa, y del citocromo P450. e) ↑ Contenido total de lípidos en el hígado.	
Ratones F344 (hembras)	* 0´025, 0'25, 2´5 mg/L * Dosis Fructosa (5%) *10 semanas * Oral	Investigar si la exposición prenatal y posnatal de BPA en combinación con carbohidratos, afecta a la masa grasa y al contenido de grasa en el hígado. Medir el volumen y distribución del tejido adiposo, el contenido de grasa en el hígado y Apolipoproteina A en plasma.	a) Monitorización peso corporal b) Resonancia magnética de imágenes para evaluar la cantidad y distribución del tejido adiposo y el contenido de grasa en hígado. c) Disección y cuantificación del peso del hígado y de la grasa peri renal. d) Análisis bioquímico de colesterol y triglicéridos. e) Western Blot (análisis de apolipoproteina A en plasma).	a) No hay cambios significativos en el peso corporal. b) No hay diferencias en el volumen de tejido adiposo. El contenido de grasa en hígado es ↑ en los expuestos comparado con el grupo control. c) No se observan cambios significativos en el peso del hígado ni en el contenido de grasa perirrenal. d) El nivel de colesterol y triglicéridos no han sido alterados con la exposición del BPA. e)↑ Apolipoproteina A.	Rönn et al., 2013
Ratones CD1 (hembras)	* 5, 50, 500,5000, 50000 µg/kg pc/día * 10 días * Oral	Examinar los efectos a largo plazo de la exposición durante el desarrollo, de BPA en relación con las enfermedades metabólicas, trabajando con un rango de dosis que abarcan; por encima de NOAL y por debajo de NOAEL.	a) Dos Test de tolerancia: a la glucosa y a la insulina. b) Medición del peso corporal y engería consumida. c) Escisión tejido graso renal y gonadal y evaluación del peso. d) Evaluación del peso del hígado y riñón. e) Recuento de células y medidas de diámetro celular para calcular el número de adipocitos y su volumen f) Radioinmunoensayo para medir niveles de insulina, leptina e adiponectina.en sangre. g) HPLC para medir el BPA no conjugado en suero del feto y la madre	a) La tolerancia a la glucosa disminuyó; mientras que para la tolerancia a la insulina no hubo cambios significativos. b) ↑ Peso corporal, y consumo de alimentos. c) El tejido graso renal, gonadal y total es mayor que en el grupo control. d) El peso del hígado es ↑ en expuestos al BPA, y el peso del riñón no muestra diferencias con el grupo control. e) El volumen y masa total de adipocitos aumentado. f)↑ Leptina e insulina y ↓ adiponectina. g) El BPA en las madres es ↑ que en fetos. *La mayoría de estos efectos tienen lugar a concentraciones bajas de BPA, la concentración más alta no produce ningún efecto.	Angle et al., 2013

Ratones Wistar (macho)	* 5 y 25 µg/kg/día * 105 días * Oral	Investigar la expresión de genes involucrados en la regulación central del eje hipotálamo-hipófisis – testicular ,la concentración de testosterona, estradiol, LH y FSH y la cantidad, actividad, integridad y morfología de los Espermas.	a) Hemocitómetro para la cuantificación de espermas. b) Quimioluminiscencia para evaluar la concetración de LH y FSH. c) Q-PCR para evaluar la expresión de Gnrhn, Lh, Esr2, Ar, Fshb y Esr1. d) Electroquimioluminis_ cencia para determinar concentraciones de testosterona y estradiol. e) Determinación de la actividad mitocondrial mediante el análisis de la actividad de citocromo C oxidasa. f) Microscopio para observar la morfología de los espermatozoides.	a) ↓ Producción esperma. b) ↓ LH y FSH. c) ↑ receptores hormonales de Gnrhn, Lh, Esr2, Ar, Fshb y ↓ Esr1. d) ↓ Testosterona y ↑ Estradiol. e) ↓ Actividad mitocondrial. f) ↑ espermatozoides defectuosos.	Wisniewski et al., 2015
Ratones Wistar (macho)	* 50 µg/kg pc/día * 24, 48 semanas * Oral	Investigar el estado de metilación del ADN y la expresión del PGC-1α en el tejido cardiaco. Determinar factores de transcripción involucrados en la expresión de PGC-1α y genes participativos en la función mitocondrial Medición/Análisis de: Presión arterial ,Cuantificación BPA, Función cardiaca, Histología del corazón, Función mitocondrial, Expresión del m-RNA y Metilación de PGC-1 α	a) Método Tail –cuff (presión de la sangre y ritmo cardiaco). b) Ecocardiografo (dimensión del ventrículo izquierdo, las paredes de este y las del septum intraventricular). c) CG-MS: cuantificar BPA total en plasma. d) Sistema Langenbdorff para evaluar la actividad celular de síntesis de ATP y la actividad mitocondrial respiratoria y el potencial de membrana mitocondrial. e) Evaluación de la función mitocondrial mediante un ensayo ATP kit luminométrico. f) Q-PCR para determinar expresión PGC-1α. g) Histología del corazón y mediante un microscópico electrónico de transmisión se observará la morfología.	a) Valores del ritmo cardiaco y presión sanguínea similares para expuestos y grupo control a las 24 semanas y a las 48 semanas. b) El ventrículo muestra una estructura normal y un alineamiento de miocitos normal para expuestos y grupos control a las 24 semanas y a las 48 semanas. c) 0,66 ± 0,15 nM BPA a las 24 semanas y 1,57 ± 0,33 nM BPA a las 48 semanas. d) Producción de ATP ↓, Disipación potencial membrana mitocondrial y disminuye la actividad mitocondrial respiratoria a las 24 semanas. A las 48 semanas se observa que una discapacidad de la función cardiaca. e) ↓ Función mitocondrial a las 24 y 48 semanas. f) ↓ Expresión de PGC-1α e inducción hipermetilación de PGC-1α a las 24 y 48 semanas, pero el efecto es más pronunciado a las 48 semanas. g) Hipertrofia del miocardio y ampliación de miocitos, esto indica; cardiomiopatía.	Jiang et al., 2015
Embriones del pez spp Danio Rerio	* 10-6– 10-8 M * 48 h * Oral	Investigar la expresión de genes específicos del tiroides.	a) Q-PCR para medir la expresión de genes específicos del tiroides.	a) ↑ La transcripción de tirpotropina a dosis de 10-5 M. ↑ expresión de pax8 a una dosis de 10-8 M ↑ Hormona estimulante de la tiroides (TSH) cuando la concentración es 10-8 M ↑ Tiroglobulina a las dosis 10-6– 10-8 M	Gentilcore et al., 2013

Embriones del pez spp *Danio Rerio*	* 1, 5, 15 μM * Comienza a las 6 h después de la fecundación y finaliza en diferentes tiempos según lo que se vaya a medir. * Oral	Evaluar los comportamientos motores, el crecimiento axonal y muscular de las motoneuronas espinales durante el desarrollo.	a) Evaluación de la locomoción. Se han analizado cuatro tipo de movimientos distintos (espontáneo, en respuesta a un toque, nadar espontáneamente y el nado en respuesta a una estimulación) a las 18-120 h de exposición. b) Ensayo de muerte celular a las 96 h de exposición. c) Evaluación producción de ROS a las 96 h de exposición. d) Medición del ADN dañado mediante un Ensayo cometa a las 96 h de exposición. e) Examen de teratogenicidad a las 96 h de exposición. f) Análisis morfométrico del crecimiento axonal.	a) Alteración del movimiento espontaneo, ↓ de la velocidad al nadar y de la respuesta al toque de estimulación. b) BPA produce muerte celular apoptótica. c) BPA induce la formación de ROS. d) BPA induce daño en el ADN. e) No hay efectos teratógenos a ninguna concentración. f) BPA induce daño en el musculo esquelético axial en todas las concentraciones. El trastorno del crecimiento axonal de las motoneuronas primarias y secundarias solo ocurre cuando la concentración es15 μM.	Wang et al., 2013
Ratones *Sprague-Dawley* (hembras)	* 40 mg/kg pc/día * 9 meses y 22 días * Oral	Ansiedad y neurocomportamiento.	a) Q-PCR. b) Prueba del campo abierto para detectar la conducta de ansiedad. c) Análisis electrofisiológico.	a) BPA ↑ DNMT1 mRNA junto con ↓ GAD67 mRNA en la amígdala basolateral. Este efecto se observa a los 45 días de exposición. b) DNMT1 media la disfunción de GABAergico y esto provoca la ansiedad observada en los descendientes. c) BPA ↑ excitabilidad en la neurona potsináptica y esto provoca la alteración del comportamiento.	Zhou et al., 2013

BPA: Bisfenol A **Q-PCR:** Método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real **DES:** Dietilbestrol **ADN:** Ácido desoxirribonucleico **SOD:** Superoxidodismutasa **CAT:** Catalasa **GPX:** Glutation peroxidasa **MDA:** Malondialdehído **NO:** Óxido nítrico **SCGE**: Ensayo de electroforesis con microgeles **HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia **TAB:** Tejido adiposo blanco **TAM**: Tejido adiposo marrón **GC- MS**: Cromatografía de gases y espectrometría de masas **HD:** Lipoproteína de alta densidad **LDL**: Lipoproteína de baja densidad **GAD67:** Glutamato descarboxilasa **ASAT:** Amino aspartato transferasa **ALAT:** Amino alanina transferasa **E2:** Estradiol **HDC:** Hidratos de carbono **ATP:** Adenosín trifosfato **NOAEL:** Nivel sin efecto adverso observable **HPLC**: Cromatografía líquida de alta eficacia **TSH:** Hormona estimulante de la tiroides **LH:** Hormona luteinizante **FSH:** Hormona foliculoestimulante **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina **GC- MS:** Cromatografía de gases y espectrometría de masas **ROS:** Especies reactivas de oxigeno **DNMT1**: Citosina 5 metiltransferasa 1

a BPA también aumenta la expresión del OCT4 y proteínas NANONG. Estas dos moléculas se han detectado en concentraciones superiores en células madre cancerígenas; por lo que la exposición a bajas dosis de BPA durante el proceso de diferenciación celular o formación de células mamarias epiteliales, altera la expresión de marcadores moleculares y aumenta la sensibilidad o el riesgo a padecer cáncer de mama.

Los tumores malignos estimulan la formación de vasos sanguíneos mediante la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína encargada del desarrollo de capilares sanguíneos. El BPA tiene un efecto estimulante en la expresión y secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y en su receptor (VEGF-R) a concentraciones nanomolares (1, 40 y 100 nM) en células ováricas cancerosas (SKOV-3 y OVCAR-3), pero no en células humanas no cancerosas (HOSEpiC), por lo que el BPA favorece el proceso de crecimiento y adaptación al organismo de los tumores (Ptak et al., 2015).

El peligro o la potencialidad de los efectos adversos para la salud de la mayoría de los disruptores endocrinos, incluyendo el BPA, se han visto cuando la exposición tiene lugar en estadios tempranos de la vida, alterando los procesos de desarrollo, maduración y/o diferenciación celular. De ahí la importancia de centrar los efectos del BPA cuando la exposición tiene lugar en los primeros estadios de desarrollo del feto o enprimeros estadios de embarazo.

El BPA es capaz de alterar el desarrollo de la placenta y consecuentemente promover complicaciones del embarazo y del feto. El trofloblasto, y más en concreto el sincitiotrofoblasto, son capas de las placenta encargadas de producir números factores de crecimiento, hormonas y enzimas importantes para el desarrollo del feto. Se ha visto que el BPA en concentraciones de 0,1 - 2 μg/mL en células primarias del trofloblasto aumenta los niveles de proteínas y de actividad de 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD2), compuesto clave para el correcto desarrollo y la maduración del feto. También se ha visto que dicha exposición, estimula la liberación de gonadotropina coriónica humana (hCG). Niveles altos de esta hormona se relacionan con complicaciones en el embarazo como puede ser un parto prematuro o una limitación del crecimiento del feto. (Rajakumar et al., 2015). El aumento de hCG también se ha visto en células endometriales estromales bajo una exposición de BPA de 1 nM, así como el aumento de los niveles del factor de inhibición de

la migración de macrogrados. El factor de inhibición es una citoquina proinflamatoria que asume un papel muy importante en el embarazo, las variaciones de sus niveles se asocian a abortos involuntarios y partos prematuros. La exposición a BPA puede alterar la función de la placenta y consecuentemente dar lugar a complicaciones del embarazo (Mannelli et al., 2015).

La exposición prenatal a BPA también altera procesos relacionado con la neurogénesis y por tanto, afecta el adecuado proceso del desarrollo cerebral. El factor de transcripción Pax6 es un compuesto esencial para el correcto desarrollo de las neuronas y sus niveles deben estar estrictamente regulados. Concentraciones relativamente bajas de BPA (0,23 – 10 mg/L) en diferentes modelos animales (Ratones BALB/cA y NOD/ShiLtJ y embriones de pollo spp *Gallus gallus*) aumentan los niveles de Pax6. Además se ha visto que el BPA induce un aumento en el espesor de parte más externa de las células granulosas del cerebelo. Por tanto, el BPA afecta a las neuronas granulares y consecuentemente puede perturbar el correcto desarrollo del cerebelo (Mathisen et al., 2013).

El BPA también ha sido relacionado, en números estudios con estrés oxidativo y con el consecuente daño del material genético. A concentraciones de 150 μM, aumenta los niveles de ROS y además es capaz de suprimir la reparación por escisión de bases en DNA dañado por oxidación, en cultivos celulares de fibroblastos de embriones de ratones (Ku70+/+ and Ku70 -/-) (Gassman y col., 2012).

Además, el BPA a concentraciones $1x10^{-4}$ mol/L, provoca un aumento en el número de micronúcleos, provocando una inestabilidad genética en el cultivo de linfocitos bovinos. El BPA tiene la capacidad de dañar el material genético y estudios muy recientes, confirman dichos efectos y lo califican como un agente genotóxico importante (Sutiaková et al., 2014).

Malonildialdehído (MDA) y óxido nitroso (NO) son biomarcadores que indican el nivel de estrés oxidativo, los valores de estas moléculas aumentan con la exposición de 0,5-50 mg/kg pc/día de BPA durante 20 días en ratones (Eid et al., 2015). Además, como en el caso anterior, el BPA es capaz de alterar los sistemas de reparación del ADN, en este caso el BPA disminuye la capacidad antioxidante total al disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes en el tejido hepático (catalasa, superoxido dismutasa y glutatión peroxidasa). Los análisis y evaluaciones del daño del material genético muestran un aumento en la cadena de ADN rota (Eid et al., 2015). Sin embargo, cuando la dosis de BPA son superiores (3000 mg/kg pc/día) y la exposición es de mayor (5 semanas), los análisis del genoma no muestran cambios en la metilación del ADN, ni daños consecuentes de la exposición del BPA en el tejido hepático de ratones C57BL/6J (Van Esterik et al., 2015).

Por lo tanto, en algunos estudios se observa que la exposición a BPA, a dosis bajas produce daño en DNA, aumenta la producción de radicales libres y disminuye la efectividad de los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo.

Los efectos del BPA al sistema metabólico es uno de los campos más estudiados. Diversos estudios sugieren que la exposición a BPA altera el metabolismo o parámetros metabólicos de importante regulación, provocando enfermedades metabólicas, como pueden ser la obesidad, diabetes o el síndrome metabólico.

No se conocen en profundidad los mecanismos mediante el cual el BPA contribuye al desarrollo de enfermedades metabólicas, pero recientemente, se ha visto que las alteraciones producidas en el ADN pueden ser un punto de partida de la afectación. La predisposición genética y los contaminantes ambientales, capaces de alterar el genoma de la población, están teniendo un papel importante en la epidemiologia de la diabetes, obesidad u otras enfermedades metabólicas.

Existen muchos genes implicados en el desarrollo de enfermedades metabólicas, por ello muchos autores analizan el estado de metilación del ADN, así como otros parámetros genéticos para investigar los efectos epigenéticos del BPA y relacionarlos con distintos efectos a nivel metabólico observados. Se ha visto que la exposición de BPA a concentraciones menores de 10 μM en células preadipocitarias de ratones *Murinae*, aumenta los niveles de metilación del ADN y aumenta la diferenciación de adipocitos. Esto se traduce a una mejora en el proceso de adipogenésis y un aumento en la probabilidad de desarrollar obesidad (Sales et al., 2013).

Por otra parte, también se ha relacionado el BPA con alteraciones metabólicas por su capacidad de alterar la secreción de adiponectinas. Las adiponectinas son moléculas secretadas por el tejido adiposo que se encargan de la regulación del metabolismo energético y por tanto, protegen al organismo del desarrollo del síndrome metabólico. Se ha analizado la liberación de adiponectina en distintos tipos de tejido adiposo humano (subcutáneo abdominal, subcutáneo abdominal de pacientes con obesidad mórbida, y tejido adiposo mamario) bajo la exposición de concentraciones nanomolares de BPA (0,1 y 1 nM). El BPA inhibe la liberación de adiponectina en todos los tejidos adiposos, aumentando el riesgo de padecer enfermedades metabólicas (Hugo et al., 2008).

La alteración de parámetros bioquímicos en plasma también se ha relacionado con la exposición a BPA, como por ejemplo los niveles de colesterol y glucosa. El BPA es capaz de sobreexpresar los genes implicados en la biosíntesis del colesterol (HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, lanosterol sintasa) y producir cambios en la homeostasia del este, favoreciendo la aparición de hipercolesterolemia. Se ha visto que los valores de colesterol total, HDL y LDL están aumentados en ratones adultos CD1 machos, que han sido expuestos a BPA (1-5000 μg/kg/día). Además también se ha observado que el BPA a estas concentraciones, disminuye la tolerancia a la glucosa, provocando hiperglicemia y aumentando así el riesgo de aparición de diabetes. Estos resultados se obtuvieron en ratones CD1 expuestos durante un periodo de 8 meses. Se observó además que la exposición durante la etapa adulta produce los mismos efectos que los de la exposición prenatal (Marmugi y col., 2014).

Angle y col. (2013) utilizaron el mismo modelo animal (ratones CD1), pero en este caso hembras embarazadas, expuestas a concentraciones de 5-5000 μg/kg/día de BPA. Los efectos observados en los descendientes fueron, el aumento del peso corporal, del peso del hígado, del tejido graso y del número de adipocitos. A nivel hormonal aumentaron los niveles de leptina y insulina y disminución de la adiponectina. Además la tolerancia a la glucosa también disminuyó. En el mismo estudio se observó si había cambios en cuanto a la energía consumida entre el grupo de expuestos al BPA y el grupo control; los resultados pusieron de manifiesto que aquellos ratones expuestos a BPA aumentaban el consumo de alimentos. Por otra parte, esta investigación también confirmó el comportamiento característico del BPA, ante las curvas dosis–efecto, ya que a concentraciones altas no se producen los efectos observados en concentraciones menores. Los resultados confirman que el BPA aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Angle et al., 2013).

Van Esterik y col., 2014, plantearon las posibilidad de que la exposición fetal de ratones C57BL/6JxFVB, a dosis consideradas no toxicas, 3000 μg/kg/día BPA, durante la gestación y la lactancia, puede inducir al organismo a una mayor susceptibilidad o predisposición genética a desarrollar obesidad u otras enfermedades metabólicas a lo largo de la etapa adulta. Los resultados de su estudio confirmaron que el BPA produce efectos a nivel metabólico en los descendientes expuestos, se sugiere la posibilidad de que el BPA produzca una alteración en el fenotipo metabólico. También se observó que los efectos no son los mismo en hembras y que en machos, por tanto el BPA no puede ser una sustancia obesogénica. Los autores concluyeron que hay factores dependientes del sexo y elementos clave en la homeostasia energética que afectan y contribuyen al fenotipo resultante.

Se ha planteado la hipótesis de que la exposición al BPA junto a

carbohidratos afecta a la masa grasa y al contenido de grasa en hígado. Ratones hembra F344, embarazadas, expuestas a dosis de BPA de 0´025, 0'25, 2´5 mg/L en agua, junto con una concentración de fructosa del 5%, durante 10 semanas (Rönn et al., 2013). El peso corporal y el volumen de tejido de adiposo no mostraban diferencias entre expuestos y grupos control, tampoco se vio ninguna alteración del colesterol y triglicéridos en plasma. Se observó que el contenido de grasa en hígado aumento así como el valor de apolipoproteina A en plasma. El estudio no demostró una evidencia en referencia a que la exposición al BPA de ratones alimentados con fructosa afecta a la masa grasa, pero sí se ha demostrado que el BPA en combinación con fructosa induce la infiltración de grasa en hígado. Los autores señalan que los resultados obtenidos en el presente estudio, son consecuencia de la combinación del BPA y la fructosa, y que se debe tener en cuenta para futuras investigaciones, la exposición a BPA junto a componentes que están en nuestra alimentación diariamente (Rönn et al., 2013)

También se ha relacionado el BPA con la capacidad de irrumpir o interferir en la actividad tiroidea. Se han investigado la expresión de genes específicos del tiroides asociados a una exposición de BPA (10^{-4} – 10^{-9} M) en células foliculares tiroideas (FRTL-5) y en modelos animales (embriones del pez spp *Danio Rerio*). Los resultados muestran que el BPA es capaz de inducir la expresión de genes involucrados en la síntesis de hormonas tiroideas (NIS, Tg, Tpo) y la proliferación de células tiroideas al incrementar el nivel del mRNA celular y sus reguladores, en los dos sustratos biológicos utilizados cuando la concentración de BPA es de 10^{-4} M durante 1 día, y cuando la concentración es más baja (10^{-8} y 10^{-9} M) aumentan más parámetros relacionados con la síntesis de hormonas tiroideas (receptores, factores de transcripción, etc) (Gentilcore et al., 2013).

El sistema reproductivo es susceptible a alteraciones causadas por diferentes tóxicos ambientales, incluyendo el BPA. En diferentes estudios se ha relacionado al exposición al BPA con la reducción de la fertilidad, el deterioro de la función sexual masculina, cambios en las concentraciones de hormonas sexuales y la reducción de la calidad de los espermas.

En los últimos años, el análisis de diferentes parámetros de los espermatozoides para determinar su estado y su funcionalidad, bajo la exposición de BPA, ha sido objeto de numerosas publicaciones. La viabilidad y la movilidad de los espermatozoides de crías de toros disminuyen cuando se exponen a concentraciones de BPA de 100 a 200 µg mL^{-1} durante 24 horas. Además el BPA disminuye la actividad mitocondrial mediante el aumento en la formación de radicales superoxido, por lo que el BPA provoca diferentes efectos adversos en el sistema reproductivo masculino (Lucacova et al., 2015).

La producción de espermas y la concentración de testosterona, hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH) se han visto disminuidos debido a una exposición de 25 µg/kg peso corporal, de en ratones *Wistar,* mientras que la concentración de estradiol ha aumentado. Además cuando se observa la morfología de los espermatozoides se observan irregularidades, y por tanto, un aumento de espermatozoides defectuosos. Por otra, parte también se han evaluado la expresión de diferentes genes involucrados en la regulación central del eje hipotálamo-hipófisis-testicular expuestos a BPA. Los análisis muestran un aumento en la liberación de los receptores de: la hormona gonadotropina, la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante. También un aumento de los recetores estrogénicos y androgénicos. También se observa una disminución de la actividad mitocondrial. Los resultados muestran, que el BPA en una dosis considerada no toxica, pone en peligro la funcionalidad correcta del sistema reproductivo masculino y disrumpe a el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (Wisniewski et al., 2015)

El sistema cardiovascular también es susceptible a la exposición de BPA. La investigación del BPA en el desarrollo de cardiomiopatías no está muy estudiada. Recientemente, un estudio realizado por Jiang y sus colaboradores (2015) reveló importantes resultados a cerca de las alteraciones producidas por el BPA en el tejido cardiaco. En este proyecto se utilizaron ratones *Wistar* machos, los cuales estuvieron sometidos a 50 µg/kg peso corporal/día durante 48 semanas. La histología de los corazones de los expuestos muestra una hipertrofia en el miocardio y una ampliación de los miocitos, esto indica, cardiomiopatía y por lo tanto un posterior deterioro de la función cardiaca. Además se vio que la expresión de PGC-1α, un importante regulador de la biosíntesis mitocondial de musculo cardiaco, disminuyo sus valores y se produjo una inducción de su estado de metilación. Los autores plantean la hipótesis que las alteraciones a nivel cardiaco y la disminución de la función mitocondrial observada, está relacionada con la desregulación del gen PGC-1α.

También se ha visto que, el BPA en concentraciones consideradas fisiológicas (10^{-9} M), desencadena actividades arritmogénicas en corazones de ratones *Sprague-Dawley* hembras, pero no en machos. También se ve alterado el transporte de calcio, provocando un aumento de los niveles de calcio en el retículo sarcoplasmático, y posibles trastornos cardiacos (Yan et al., 2011)

Por último, el BPA también provoca alteraciones a nivel neuronal. La morfología de las neuronas motoras primarias y secundarias, se ve afectada bajo una exposición de 15 µM en embriones del pez spp *Danio Rerio*. Además la exposición a BPA a concentraciones menores (1-15 µM) altera la locomoción, ya que se ve perjudicado el movimiento espontáneo de los embriones, también decrece la velocidad al nadar y la respuesta a la estimulación. Las deficiencias observadas en la locomoción podrían relacionarse con el daño producido en la estructura del musculo esquelético (Wang et al., 2013).

Por otra parte, a nivel neuronal, también se ha visto que le BPA aumenta la excitabilidad de la neurona postsináptica, provocando una alteración el comportamiento de ratones *Sprague-Dawley* hembras, expuestas a 4 mg/kg peso corporal. Los análisis del genoma muestran una expresión estimulada de la enzima DNMT1 en la amigadla basolateral cuando se someten a los ratones a BPA. El incremento de DNMT1 es el responsable de los cambios en el neurocomportamiento, y de la aparición de síntomas de ansiedad y el mecanimos por el cual se produce parece estar relacionado con un a inhibición de la via gabaérgica. Por lo que el BPA puede tener efectos relacionados con la ansiedad (Zhou et al., 2013).

Conclusiones

El BPA es un disruptor endocrino cuya fuente de exposición más importante es a través de la dieta, principalmente a través de los alimentos envasados. La autorización y utilización de BPA en la industria alimentaria se encuentra regulado a través del Reglamento 10/2011 del 14 de enero de 2011, en la que se establece que el límite de migración del envase al alimento es de un máximo de 0,6 mg/kg de alimento/día, mientras que la ingesta diaria tolerable establecida es de 4 µg/kg pc/ día.

Los efectos producidos por el BPA se relacionan con cáncer, alteraciones en el desarrollo y a nivel neuronal, daño en el material genético por la producción de especies reactivas de oxígeno, enfermedades metabólicas y cardiovasculares, así como con alteraciones en el sistema reproductor, relacionadas la mayoría, con la afectación de la fertilidad. Según el informe de la EFSA realizado en el 2015, la dosis de exposición diaria de la población, no presenta riesgo para la población; sin embargo, pueden observarse consecuencias más acusadas en población sensible y expuesta durante gestación y lactancia.

Bibliografía

1. Angle BM, Do R.P, Ponzi D, Stahlhut R.W, Drury B.E, Nagel S.C, Welshons W.V, Besch-Williford C.L, Palanza P, Parmigiani S, Vom Saal F.S, & Taylor J.A,2013. Metabolic disruption in male

mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation.Reproductive toxicology.42:256-268.

2. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E & Nadal Á, 2012. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. Molecular and cellular endocrinology.355:201-207.

3. Bhan A, Hussain I, Ansari K.I, Bobzean S.A, Perrotti L.I, & Mandal S.S, 2014. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology:141:160-170.

4. Bhan A, Hussain I, Ansari K.I, Bobzean S.A, Perrotti L.I, & Mandal S.S, 2014. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology:141:160-170.

5. Braun JM & Hauser R, 2011. Bisphenol A and children's health. Current opinion in pediatrics.23:233-239.

6. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT & Gore AC, 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine reviews.30:293-342.

7. Dodds EC & Lawson W, 1936. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. Nature.137:996.

8. Eid J.I, Eissa S.M, & El-Ghor A.A, 2015. Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring. The Journal of Basic & Applied Zoology.71:10-19.

9. FitzGerald RE & Wilks MF, 2014. Bisphenol A- Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied. Toxicology letters.230:368-374.

10. Flint S, Markle T, Thompson S & Wallace E, 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. Journal of environmental management.104:19-34.

11. Gassman NR, Coskun E, Stefanick DF, Horton JK, Jaruga P, Dizdaroglu M & Wilson S.H. Bisphenol A promotes cell survival following oxidative DNA damage in mouse fibroblasts. PloS one [serial online] 2012;011e819. Internet: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118819 (acceso 18 de Febrero de 2015).

12. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML & Covaci A, 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. Food and chemical toxicology, 50:3725-3740.

13. Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, Felice M, & Ambrosino C,2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression.Toxicology.304:21-31.

14. Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, Felice M, & Ambrosino C,2013. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression.Toxicology.304:21-31.

15. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW & Ben-Jonathan N,2008. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. Environ Health Perspect.116:1642-1647.

16. Hussain I, Bhan A, Ansari KI, Deb P, Bobzean SA, Perrotti LI, & Mandal, SS, 2015. Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms.1849:697-708.

17. Hussain I, Bhan A, Ansari KI, Deb P, Bobzean SA, Perrotti LI, & Mandal, SS, 2015. Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms.1849:697-708.

18. Jiang Y, Xia W, Yang J, Zhu, Y, Chang, H, Liu J, Huo W, Xu B, Chen X, Li Y, Xu S, 2015. BPA-induced DNA hypermethylation of the master mitochondrial gene PGC-1α contributes to cardiomyopathy in male rats.Toxicology.*329*:21-31.

19. Lorber M, Schecter A, Paepke O, Shropshire W, Christensen K & Birnbaum L, 2015. Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures. Environment international.77:55-62.

20. Lucacova J, Jambor T, Knazixka Z, Tvrda E, Kolesarova A & Lukac N, 2015. Dose- and time-dependent effects of bisphenol A on bovine spermatozoa in vitro. Enviromental Science and Health.50:669-676.

21. Ma XF, Zhang J, Shuai HL, Guan BZ, Luo X, & Yan RL, 2015. IKKβ/NF-κB mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells. Archives of biochemistry and biophysics.573:52-58.

22. Mannelli C, Ietta F, Carotenuto C, Romagnoli R, Szostek AZ, Wasniewski T, Skarzynski DJ & Paulesu, L, 2014. Bisphenol A Alters-hCG and MIF Release by Human Placenta: An In Vitro Study to Understand the Role of Endometrial Cells. Mediators of inflammation. 635364.

23. Marmugi A, Lasserre F, Beuzelin D, Ducheix S, Huc L, Polizzi A, Chetivaux T, Martin P, Guillou H, Mselli-Lakhal L,2014. Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycemia and hypercholesterolemia in mice.Toxicology, FALTA (manuscrito aceptado no indica nº paginas)

24. Mathisen G.H, Yazdani M, Rakkestad K.E, Aden P.K, Bodin J, Samuelsen M, Nygaard U.C, Goverud I.L, Gaarder M, Loberg E.M, Bolling A.K, Becher R, & Paulsen R.E,2013. Prenatal exposure to bisphenol A interferes with the development of cerebellar granule neurons in mice and chicken.International Journal of Developmental Neuroscience.31:762-769.

25. Mileva G, Baker SL, Konkle A & Bielajew C, 2014. Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. International journal of environmental research and public health.11:7537-7561.

26. Moya J, Bearer CF & Etzel RA, 2004. Children's behavior and physiology and how it affects exposure to environmental contaminants. Pediatrics.113:996–1006.

27. Orden PRE/628/2011, de 22 de marzo, por la cual se modifica el Anexo II del Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. (BOE núm 72 , de 25 de marzo de 2011)

28. Petzold S, Averbeck M, Simon JC, Lehman I, Polte T, 2014. Lifetime-Dependent Effects of Bispgenol A on Asthma Development in an Experimental Mouse Model. PLoS ONE [serial online] 2014;9(6):e100468. Internet: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0100468 (acceso 20 de Junio de 2014)

29. Ptak A & Gregoraszczuk EL, 2015. Effects of bisphenol A and 17β-estradiol on vascular endothelial growth factor A and its receptor

expression in the non-cancer and cancer ovarian cell lines. Cell biology and toxicology.31:187-197.

30. Ptak A, Rak-Mardyła A, & Gregoraszczuk, EL, 2013. Cooperation of bisphenol A and leptin in inhibition of caspase-3 expression and activity in OVCAR-3 ovarian cancer cells. Toxicology in Vitro.27:1937-1943.

31. Rajakumar C, Guan H, Langlois D, Cernea M & Yang K, 2015. Bisphenol A disrupts gene expression in human placental trophoblast cells. Reproductive Toxicology.53:39-44.

32. Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el cual se aprueba a lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. (BOE núm 131 de 30 de mayo de 2008)

33. Reglamento 10/2011, de 14 de enero, por el cual se aprueba la Norma de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.

34. Reglamento 321/2011, de 1 de abril, por el cual queda restringido el uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes.

35. Rochester JR, 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. Reproductive toxicology.42:132-155.

36. Rönn M, Kullberg J, Karlsson H, Berglund J, Malmberg F, Örberg J, Lind L, Ahlström H, Lind P.M, 2013. Bisphenol A exposure increases liver fat in juvenile fructose-fed Fischer 344 rats.Toxicology.303:125-132.

37. Sales LB, Kamstra JH, Cenijn PH, Van Rijt LS, Hamers T & Legler J, 2013. Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. Toxicology in vitro.27:1634-1643.

38. Scientific Opinion of the Panel Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Bisphenol A. EFSA Journal 2006.428:1-75.

39. Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC). EFSA Journal 2008.759:1-10

40. Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. EFSA Journal 2010.8:1829.

41. Scientific Opinion Statement on the ANSES reports on Bisphenol A. EFSA Journal 2011.9:2475

42. Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A(BPA) in foodstuffs. EFSA Journal 2015.13:3978.

43. Summary and conclusions of the report on the health effects of bisphenol A - Reports on the health effects of bisphenol A and on the uses of bisphenol A

44. Sutiaková I, Kovalkovicová N, Sutiak V, 2014. Micronucleus assay in bovine lymphocytes after exposure to bisphenol A in vitro. In vitro cellular & Developmental Biology-Animal.50:502-506.

45. Van Esterik J.C.J, Vitins A.P, Hodemaekers H.M, Kamstra J.H, Legler J, Pennings J.L.A, Steegenga W.T, Lute C, Jelinek J, Issa J.P.J, Dollé M.E.T, & van der Ven L.T.M,2015. Liver DNA methylation analysis in adult female C57BL/6JxFVB mice following perinatal exposure to bisphenol A.Toxicology letters.232:293-300.

46. Van Esterik JCJ, Dollé MET, Lamoree MH, Van Leeuwen SPJ, Hamers T, Legler J, Van der Ven LTM, 2014. Programming os metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by exposure to bisphenol A during gestation and lactation.Toxicology.321:40-52

47. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, & Schoenfelder G, 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. Environmental health perspectives.1055-1070.

48. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, Shioda T, Soto AM, Vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers DR, 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. Endocrine Reviews.33:378.

49. Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, Hunt PA, Newbold RR, Rubin BS, Saili KS, Soto A, Wang H & Vom Saal FS, 2013. Low dose effects of bisphenol A: An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. Endocrine disruptors. e26490.

50. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N & Welshons WV, 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). Reproductive toxicology.24:139-177.

51. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS & Soto AM, 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. Endocrine reviews.30:75-95.

52. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG & Dekant W, 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. Chemical research in toxicology.15:1281-1287.

53. Völkel W, Bittner N & Dekant W, 2005. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Drug Metabolism and Disposition.*33*:1748-1757.

54. Wang X, Dong Q, Chen Y, Jiang H, Xiao Q, Wang Y, Li W, Bain C, Huang C & Yang D, 2013. Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish.Aquatic toxicology.142:104-113.

55. Wisniewski P, Romano R.M, Kizys M.M.L, Oliveira K.C, Kasamatsu T, Giannocco G, Chiamolera M.I, Dias-da-Silva M.R,2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis.Toxicology.329:1-9.

56. Yan S, Chen Y, Dong M, Song W, Belcher SM & Wang HS, 2011. Bisphenol A and 17β-estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. PloS one.6:e25455.

57. Yang L, Luo L, Ji W, Gong C, Wu D, Huangb H, Liub O, Xiab B, Hub G, Zhangb Q, Liub J, Zhangc W & Zhuang Z, 2013. Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. Toxicology letters.218:187-193.

58. Zhou R, Chen F, Chang F, Bai Y & Chen L,2013. Persistent overexpression of DNA methyltransferase 1 attenuating GABAergic inhibition in basolateral amygdala accounts for anxiety in rat offspring exposed perinatally to low-dose bisphenol A. Journal of psychiatric research.47:1535-1544.

59. Margelefsky EL, Zeidan RK & Davis ME, 2008. Cooperative catalysis by silica-supported organic functional groups. Chemical Society Reviews, 37:1118-1126.

60. Hoban R, 2012. Scientists in the middle of the BPA debate. Consumer News, Environmental health, featured public health.

61. Munguia-Lopez EM, Gerardo-Lugo S, Peralta E, Bolumen S, & Soto-Valdez H, 2005. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. Food additives and

contaminants. *22*:892-898.

62. Loi Nº 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A.

63. Matthews JB, Twomey K & Zacharewski TR, 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β. Chemical research in toxicology.*14*:149-157

ACTAS DE LAS III JORNADAS DE FORMACIÓN EN TOXICOLOGÍA 2015

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

Comité Organizador: Dra. Lara Manyes, Laura Escrivá, Celia Fernández-Blanco, Ana García Moraleja, Beatriz Mallebrera, Yelko Rodríguez, Federica Saladino, Belén Serrano, Elena Tatay, Josefa Tolosa.

Organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) el 16 de abril de 2015 en la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València.

EDUCACIÓN EN TOXICOLOGÍA

Comunicaciones orales.

Moderadora: *Dra. Mónica Fernández Franzón.*

O1) PROCESO DE ACREDITACIÓN DEL MÁSTER EN CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.

Ferrer E., Berrada H., Fernández M., Juan A., Ruiz M.J. y Font G.
Área de Toxicología. Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Facultat de Farmàcia. Universitat de València.

En España se abre una nueva fase del proceso de evaluación para la calidad de la Educación Superior con la renovación de la acreditación de las titulaciones oficiales. La legislación establece que la acreditación inicial de los títulos oficiales debe ser renovada periódicamente a partir de la fecha de su verificación o desde la fecha de su última acreditación. El Programa para la renovación de la acreditación (ReAcredita) de las titulaciones oficiales de las universidades tiene como objetivo comprobar si los resultados del título son adecuados y permiten garantizar la continuidad de la impartición del mismo hasta la siguiente renovación de la acreditación. El Programa ReAcredita en la Comunitat Valenciana está organizado en dos fases: Una primera fase denominada "Autoevaluación" en la que la universidad describe y valora la situación del título respecto a criterios y directrices establecidos. El resultado de esta fase es el Informe de Autoevaluación del Título (IAT) que realiza la universidad; Una segunda fase denominada "Evaluación Externa" en la que la Agencia Valenciana d'Avaluació i Prospectiva (AVAP) realiza una valoración de la situación del título en aras a determinar el grado de cumplimiento del mismo frente a los criterios establecidos en el modelo de evaluación disponible en la página web de la AVAP, basando sus afirmaciones en datos objetivos. El resultado de esta fase es el Informe de Evaluación Final de la renovación de la acreditación. En este trabajo se muestra el procedimiento seguido para la acreditación del Máster en Calidad y Seguridad Alimentaria, así como los resultados obtenidos en el mencionado proceso de acreditación.

Palabras clave: acreditación, máster, calidad y seguridad alimentaria.

O2) APLICACIÓN DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS EN TOXICOLOGÍA EN LA PRÁCTICA PROFESIONAL.

Fernández B 1., Unda E1., Manyes L2.
1 SIGESA. Guatemala 14, 28016, Madrid, Spain.2 Laboratorio de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, España.

Las personas profesionales de las áreas sanitarias y medioambientales toman decisiones sobre evaluación, interpretación y prevención de riesgos químicos en su rutina laboral. La toma de decisiones se efectúa de manera rápida, ajustada a la legalidad vigente y siempre basada en los datos científicos disponibles más recientes. Para ello no sólo necesitan disponer de acceso a bases de datos toxicológicas, sino también ser capaces de manejar eficientemente las herramientas que ponen a su alcance estos recursos para localizar la información actualizada, suficiente y relevante, que les permita conocer y gestionar adecuadamente los posibles riesgos. Las organizaciones y administraciones públicas utilizan dos tipos de datos, los obtenidos con finalidad científica y los requeridos por la legislación, para la elaboración de informes y documentos técnicos que se aprovechan como base para generar nuevas normativas y legislar límites, siendo ambos incluidos en otras bases de datos. Por otra parte, es importante que estén disponibles los informes de las evaluaciones del riesgo o de los posteriores estudios de control del cumplimiento de los límites administrativos. RIGHT ANSWER es un software especializado en aportar soluciones de conocimiento y de documentación orientadas a la gestión del riesgo químico tanto desde el punto de vista técnico y administrativo como del legal. En él se combinan diferentes tipos de bases de datos (propias, públicas y con licencia) siguiendo un proceso editorial preciso. RIGHT ANSWER ha demostrado ser una herramienta extremadamente útil, en especial para higienistas industriales, gerentes de materiales peligrosos y equipos de respuesta de emergencia, entre otras profesiones.

Palabras clave: RIGHT ANSWER, base de datos, profesionales de toxicología.

Comunicaciones tipo cartel.

C1) LA RED IBEROAMERICANA DE TOXICOLOGÍA Y SEGURIDAD QUÍMICA EN LA FORMACIÓN DE LA TOXICOLOGÍA.

de la Peña E 1., Pillco A ., Herrero O 2.,Gutierrez R 3.,Font G 4.,Manyes L4., Ruiz MJ 4.,Cavieres F 5.,Escalante P 6.
1/ Consejo Superior de Investigaciones Científicas / Red Iberoamericana de Toxicología y Seguridad Química (http://ritsq.org); 2/ Universidad Nacional de Educación a Distancia; 3/ Instituto Mexicano de Seguridad Social, 4/ Universitat de València, 5/ Universidad de Valparaíso.6/ Toxicología. Hospital Juárez de México.

La Red Iberoamericana de Toxicología y Seguridad Química RITSQ, se inicia en marzo de 2008 y desde entonces ha tenido 70.791 visitas a la página web de la misma, se han registrado 1.133 personas de 41 países y desde entonces hemos realizado y presentado 66 carteles en Reuniones, Conferencias y Reuniones donde se mantienen de forma constante los Objetivos de la RITSQ: 1. Coordinar la participación de los diferentes grupos existentes en universidades y organismos de investigación de Iberoamérica, implicados en estudios relacionados con la Toxicología, 2. Fortalecer la colaboración y el intercambio académico entre los programas de Doctorado y Maestría de diferentes países iberoamericanos que tengan como objeto el estudio y la investigación en Toxicología o áreas relacionadas, 3. Favorecer la realización de proyectos de investigación conjuntos entre docentes e investigadores de Iberoamérica, pasantías estudiantiles y eventos académicos; 4. Profundizar en el estudio de métodos de ensayo de corta y larga duración utilizados en la evaluación de la carcinogenicidad, la mutagenicidad y la toxicidad para la reproducción de sustancias y mezclas de productos químicos, 5. Desarrollar y estandarizar métodos analíticos para la identificación y determinación de biomarcadores de exposición, efecto y .susceptibilidad para sustancias y productos químicos en el hombre y el medio ambiente; 6. Aplicar métodos de evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de sustancias y productos químicos, 7. Fomentar el intercambio científico de profesionales interesados alimentaria; y 8. Propiciar el uso de métodos alternativos a la experimentación animal (*www.remanet.net*). La RITSQ se sigue desarrollando con los auspicios de la AETOX y su información es un nexo de unión entre la comunidad científica y docente de Iberoamérica, Portugal y España. El número de visitas de la RITSQ han sido las siguientes: 9.609/ 2009; 14.340/ 2010; 29.246/ 2011; 39.056/ 2012; 49.726/ 2013; 68.251/ 2014; y 2.540/ 2015 de enero a

abril; lo que demuestra su difusión; y la la máxima atención que se le presta a la publicación de anuncios de la celebración de eventos, la colaboración y el intercambio académico y la activa participación, de los grupos existentes en universidades y organismos de investigación de Iberoamérica, implicados en la docencia, estudio e investigación que están interesados y relacionados con el desarrollo de la Toxicología.

Palabras clave: Red, Iberoamérica, Toxicologia, Seguridad, Productos Químicos.

C2) ACTIVIDADES DE LA SECCIÓN EDUCACIÓN EN TOXICOLOGÍA DESDE SU CREACIÓN.

Font G., Ruiz M.J., Berrada H., Ferrer E., Juan-García A., Fernández M.
Área de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Desde su creación en 2008, de La Sección de Educación en Toxicología de la Asociación Española de Toxicología (AETOX) se ha marcado varios objetivos en el ámbito de la formación y docencia en Toxicología dando a conocer la participación de la Toxicología en estudios de grado, postgrado y másteres. La implantación del Espacio Europeo de Educación Superior (EEES) ha llevado a la aparición de nuevas asignaturas y grados en los que la incorporación de las enseñanzas en toxicología ha tenido un papel importante. Con ello, la aplicación de nuevas metodologías docentes ha transformado modelo de aprendizaje tradicional, basado en la acumulación de conocimientos, hacia un modelo basado en la adquisición de competencias por parte de los alumnos. En este contexto, la sección de Educación en toxicología ha querido difundir las nuevas realidades a las que se enfrenta la educación, y ser participe diferentes programas académicos relacionados con la educación en Toxicología. La sección ha promovido la realización de diferentes jornadas como la Jornada de Docencia de la Toxicología en el EEES: nuevos retos, el 20 noviembre 2008 y V Jornada de Innovación Docente en Toxicología, el 19 de Febrero 2010, ambas realizadas en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Madrid. En la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València se realizaron dos Jornadas de Formación en Toxicología, el 29 de Junio de 2013, y el 24 de Junio de 2014. Por otro lado, en el 2010 la revista de toxicología publicó un monográfico sobre "Educación en Toxicología" (Revista de Toxicología Vol. 27 No. 1-2).

MÉTODOS TOXICOLÓGICOS

Comunicaciones orales.

Moderadora: *Dra. María José Ruiz Leal.*

O1) CITOTOXICIDAD, ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS CHO-K1 EXPUESTAS A BEAUVERICINA.

Mallebrera B., Font G., Ruiz MJ.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

La Beauvericina (BEA) es un metabolito secundario producido por hongos del género *Fusarium* y *Beauveria bassiana*. La BEA produce apoptosis, daño en el DNA, disrupción del ciclo celular e inhibición de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa en diversas líneas celulares. El objetivo de este estudio fue determinar la citotoxicidad, el estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica (LPO), y la defensa celular (catalasa, CAT; superóxido dismutasa, SOD; glutatión peroxidasa, GPx; glutatión transferasa, GST; glutatión reductasa, GR; y los niveles de glutatión, GSH) en células de Ovario de Hámster Chino (CHO-K1) expuestas a BEA. Los resultados obtenidos demuestran que la BEA es citotóxica (IC50 entre 10.66±3.76 y 2.2±3.34μM). La BEA incrementó la producción intracelular de ROS 1.3 veces y la LPO en un 35%, respecto del control. Tras la exposición a BEA, la actividad de la CAT se incrementó en un 70%, de la SOD entre un 37% y un 134%, de la GPx del 35% al 66% y de la GST del 61% al 89%, respecto del control. Los niveles de GSH disminuyeron en un 18% y la actividad GR en un 43%, respecto del control. En conclusión, la BEA produce citotoxicidad, ROS y LPO en células CHO-K1, lo que podría estar correlacionado. Los resultados sugieren que el GSH y enzimas relacionadas, la CAT y la SOD juegan un papel importante en el sistema de defensa antioxidante frente a la BEA en células CHO-K1. Este trabajo forma parte de un trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2013-43194-P.

Palabras Clave: beauvericina, células, citotoxicidad, glutatión, estrés oxidativo.

Comunicaciones tipo cartel.

C1) EFECTOS TÓXICOS DE LA BEAUVERICINA MEDIANTE MÉTODOS *IN VITRO*: REVISIÓN.

Mallebrera B., Font G., Ruiz MJ.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos capaces de producir daños en seres humanos y animales a través de la ingestión, inhalación o contacto con la piel. La Beauvericina (BEA) es una micotoxina emergente de *Fusarium* producida por hongos de este mismo género y *Beauveria bassiana*. La BEA es un contaminante de cereales y derivados. Se ha demostrado que la BEA es citotóxica en varias líneas celulares, con un rango de valores de IC50 entre 1.0 y 20.6 μM. Debido a la capacidad ionofórica de la BEA, ésta es capaz de incorporarse en membranas celulares formando canales que permiten su entrada y la de otros tóxicos dentro de la célula, además de formar complejos con cationes esenciales (Ca2+, Na+, K+) que pueden afectar a la homeostasis iónica. El estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno (ROS) han sido considerados como un posible mecanismo en la inducción de la toxicidad de la BEA. Un incremento en la producción de ROS (entre 1.4 y 4 veces el control) y peroxidación lipídica (LPO; entre el 80% y 207%) en tiempo y concentración dependientes, han sido demostrados en diferentes líneas celulares después de la exposición a BEA. Así mismo, para protegerse frente al estrés oxidativo producido por la BEA, se ha observado un incremento en las actividades enzimáticas relacionadas con la capacidad detoxicante celular. En este sentido, se ha obtenido un incremento de la actividad de la superóxido dismutasa entre el 37% y 134%, de la catalasa del 70%, de la glutatión peroxidasa hasta del 35% y de la glutatión transferasa entre el 61% y 89%. Mientras que se evidencia una disminución de los niveles de glutatión (entre el 31% y 18%). Por otro lado, se ha demostrado que tras la exposición de células a BEA se produce: despolarización de la membrana mitocondrial entre el 2% y el 95%, disrupción del ciclo celular entre 1.1 y 1.5 veces el control y muerte celular entre el 100% y el 286%. En conclusión, se puede sugerir que la BEA produce citotoxicidad a través de la vía ROS dependiente, a su vez, la disfunción mitocondrial estaría implicada con la muerte celular; y el glutatión y las actividades enzimáticas jugarían un importante papel en la defensa antioxidante frente a la BEA.
Este trabajo forma parte de un trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2013-43194-P.

Palabras Clave: beauvericina, *in vitro*, células, citotoxicidad.

C2) CITOTOXICIDAD INDIVIDUAL Y COMBINADA DE MICOTOXINAS DE ALTERNARIA EN CÉLULAS CACO-2.

Fernández-BlancoC., Dolz I., Font G., Ruiz M J.
Laboratorio de Toxicología. Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Av. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot, Valencia, España. celia.fernandez-blanco@uv.com.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos principalmente pertenecientes a los géneros Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria y Claviceps. El Alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME) son micotoxinas producidas por *Alternaria sp*.

Las mezclas de estas micotoxinas pueden estar frecuentemente presentes en alimentos como verduras y cereales causando efectos adversos en los animales y los seres humanos. El objetivo del presente estudio es comparar la citotoxicidad del AOH y AME de manera individual y combinada durante 24, 48 y 72 h en células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2). La citotoxicidad in vitro se llevó a cabo en el rango de concentraciones de 3.125-100 μM para el estudio individual del AOH y AME. La citotoxicidad combinada se estudió en un rango de 0.125 -30 μM en una relación 1:1. Ambos ensayos se realizaron mediante el método de la sal de tetrazolio (MTT), el cual implica una reducción temprana en las células viables por los componentes de la cadena respiratoria (deshidrogenasas mitocondriales). Los ensayos de citotoxicidad individuales no mostraron IC50 a ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados. Sin embargo, se obtuvo un IC50 =17.25 μM para la combinación de AOH +AME a las 72 h de exposición. Con el análisis del isobolograma se observó el efecto de interacción producido con la mezcla ensayada.

Palabras clave: micotoxinas, citotoxicidad, combinaciones, isobologramas.

TOXICOLOGÍA FORENSE

Comunicaciones tipo cartel.

C1) ALGO MÁS QUE UN TÓXICO O UNA DROGA DE ABUSO, LA ESCOPOLAMINA (BURUNDANGA).

Rodríguez I. Estudiante de 4ª Criminología, Universitat de València.

Ya desde hace años se conoce que ciertas plantas pueden producir efectos tóxicos como es el caso de los derivados de las plantas pertenecientes al género Datura o Brugmansia. Dichas especies son originarias de Sudamérica, pero su cultivo se ha extendido alrededor del mundo y actualmente se encuentran en diferentes países. La escopolamina, un éster del ácido tropánico con la base escopina (C17H21NO4), es el principal principio activo de dichas plantas. Se trata de un alcaloide vegetal natural, que tiene efectos anticolinérgicos potentes y que se lleva utilizando en la medicina durante décadas; está disponible en comprimidos, jarabes, polvos, parches transdérmicos y soluciones para inyección y por lo general se combina con otros agentes en productos comerciales. Se emplea para el tratamiento de náuseas, enfermedades relacionadas con el aparato locomotor y también por ejemplo de la rinitis alérgica. Pero una sobredosis de dicha sustancia (dosis que superen los 100 mg en adultos y 10 mg en niños) provocan efectos tóxicos que tienen como resultado alteraciones en el Sistema Nervioso Periférico (disminución de secreción glandular, dilatación de las pupilas, ceguera transitoria, taquicardia e hipertermia entre otros) y en el Sistema Nervioso Central, ocasionando un estado de pasividad completa con actitud de "automatismo", de manera que recibe y ejecuta órdenes sin oposición, desapareciendo los actos inteligentes de la voluntad y la memorización de hechos, lo cual puede ser aprovechado por los delincuentes (Ardila A, Moreno C. 2006). En algunas personas puede causar desorientación, excitación psicomotriz, habla incoherente, euforia, alucinaciones, delirio, comportamiento paranoide y agresividad. En dosis muy altas causa convulsiones, depresión severa, coma e incluso la muerte. Desde hace unos años el uso de dicha sustancia es frecuente en España según explica el Cuerpo Nacional de Policía, a pesar de que no existen estadísticas sobre este, ya que no representan una realidad, sino que se corresponden tan solo con una pequeña parte de las víctimas de este fenómeno (Gutiérrez de Salazar M. 2014). Los delitos que se asocian con mayor frecuencia con esta sustancia son los hurtos, robos y el abuso sexual. La escopolamina es una sustancia inodora e insípida y puede administrarse tanto por vía oral, respiratoria o a través de la piel. La base de la averiguación de si alguien ha sido intoxicado será el cuidadoso interrogatorio, el examen de las circunstancias previas y el examen físico minucioso, además de la práctica de pruebas de análisis toxicológico (en sangre, orina y contenido gástrico). El efecto máximo de toxicidad se alcanza durante una a dos horas y va cediendo paulatinamente; se metaboliza parcialmente en el hígado por hidrólisis enzimática, durante las siguientes 12 a 72 horas, en ácido trópico y escopina y sólo un 10% se excreta a través del riñón sin metabolizarse. Vemos por tanto como la escopolamina reúne las condiciones perfectas para ser el medio por el que cometer un delito. Destacar que el uso simultáneo de escopolamina con depresores del SNC puede potenciar los efectos de esta, recibiendo el nombre de "Nueva Burundanga" (Gutiérrez de Salazar M. 2014).

Palabras clave: Escopolamina, Burundanga, delitos.

C2) INTOXICACIÓN POR GASES NERVIOSOS.

Heskouri Benlemlih, H.; Muñoz Hernández, E.; Gómez Portolés, J. M.
Laboratorio de Toxicología. Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Av. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot, Valencia, España. hebenhes@alumni.uv.es
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

En la primera mitad del siglo XX se sintetizaron los compuestos organofosforados tabún (GA), sarín (GB), somán (GD) y VX. Tras observar sus potentes efectos tóxicos a nivel nervioso, éstos fueron utilizados como armas químicas en conflictos armados. Estos gases han causado la muerte de millones de personas debido a su toxicidad. El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre los efectos producidos por la intoxicación por vía inhalatoria y transdérmica de estos agentes nerviosos. Para ello se ha hecho uso de las bases de datos PubMed y ScienceDirect. Los resultados obtenidos demuestran que debido a la inhibición de la acetilcolinesterasa en las uniones neuromusculares y en el sistema nervioso central, los gases organofosforados producen un síndrome muscarínico (miosis, sudoración, náuseas, vómitos, diarreas, fallo respiratorio, bradicardia, hipotensión, etc.); un síndrome nicotínico (calambres con parálisis de miembros y músculos respiratorios, parálisis de músculos voluntarios) y un síndrome neurológico (somnolencia, letargia, fatiga, confusión mental, temblor, convulsiones, cianosis, coma). Concluimos que debido a la peligrosidad de estas sustancias se debería de informar más sobre estos compuestos para concienciar a la población y agilizar los protocolos de seguridad. Además creemos que es importante saber las medidas que se deberían tomar en el caso de encontrarnos con una intoxicación de este tipo, en concreto la medicación más efectiva.

Palabras clave: Agentes nerviosos, Organofosforados, Vx, tabún, sarín, somán, serie G.

TOXICOLOGÍA CLÍNICA

Comunicaciones tipo cartel.

C1) TOXICIDAD Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACRILAMIDA.

Iranzo MP, Olcina MA, Juan-García A.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Hace 20 años, la Agencia Internacional de Investigación Contra el Cáncer (IARC) catalogó a la acrilamida como posible cancerígeno en humanos tipo 2A, en base a estudios realizados con animales. En 2002, la Autoridad Alimentaria Nacional Sueca informaba por primera vez de la presencia de acrilamida en alimentos ricos en almidón cocinados a altas temperaturas; y posteriormente en 2008 desde diversos institutos de investigación españoles se señalaba la presencia de la acrilamida en alimentos comercializados en España, y se advertía de los peligros de toxicidad y su relación con procesos cancerígenos. La JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) llevo a cabo estudios de evaluación de la acrilamida entre 2005 y 2010, con el fin de establecer un valor de referencia toxicológico, sin embargo esto no fue posible. Estudios recientes sobre acrilamida en EEUU, señalan los efectos de exposición

a esta sustancia tóxica a grupos poblacionales como niños y personas obesas, indicando un aumento de peligrosidad de la acrilamida, debido principalmente a las diferencias metabólicas. Teniendo en cuenta los efectos toxicológicos asociados a la acrilamida y el reciente interés por la comunidad científica en el establecimiento de niveles seguros de consumo, en este trabajo se recogen: por una parte, los factores necesarios para llevar a cabo una valoración toxicológica de esta sustancia (genotoxicidad, efectos en células humanas; clastrogenicidad; carcinogenicidad; neurotoxicidad y efectos sobre el sistema reproductivo en animales), y por otra la situación actual de los últimos proyectos de investigación biotecnológica para garantizar la seguridad de la acrilamida. Estos proyectos se están llevando a cabo en colaboración con el sector industrial y van dirigidos al desarrollo de nuevos sistemas de procesado de alimentos para reducir sus niveles.

Palabras Clave: acrilamida, efectos tóxicos, seguridad, consumo.

C2) DESIGNER DRUGS.

Martí P., Cantó A., Castellar A., Giner M.
Grupo ARA de Farmacia. Departamento de Medicina Preventiva, Facultat de Farmàcia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot (Valencia).

Designed drugs are substances that change frequently in response to market trends and legislative controls, that is why some authors define "designer drugs" as those drugs which introduce modifications in their chemical structure in order to side-step the law. Although the term "designer drugs" is not precisely defined, it is understood to refer to commonly abused drugs such as amphetamine derivatives such as Ecstasy (3,4, Methylenedioxymethamphetamine; MDMA) and methamphetamine, fentanyl, ketamine, LSD, PCP, quaaludes, methcathinone, and GHB (gammahydroxy butyrate). Methamphetamine is a synthetic stimulant, also known as "meth", "seep" or "crystal". Amphetamines and MDMA (ecstasy), are well-known drugs of abuse, were originally used in the clinical setting. However, these active principles are still being abused as stimulant or "club drugs". Both drugs are illegally produced in Belgium and The Netherlands mainly, being exported to other European countries. Synthetic opioids have become popular among drug users since their appearance. Among the synthetic opioids, analogs of fentanyl consumption have followed an increasing trend. Prescription drugs with a clear pharmacological purpose are being misused in the pursuit of dissociative recreational effects. This is the case of benzodiazepines (anxiolytics and hypnotics) and ketamine (anesthetic). Benzodiazepines remain one of the most prescribed medication groups. With such high levels of prescribing, it is not surprising that dependence to these drugs arises from a reward-seeking effect by the patient. Given the current situation, it is important to take into account the potential for the development of dependence on prescription drugs, or what is more concerning, extending the fashion of using them for recreational purposes which have nothing to do with their originally-intended use. Understanding the way in which these drugs are abused is of paramount importance for the establishment of effective measures against these practices.

C3) EFECTOS TERATÓGENOS DE LOS FÁRMACOS.

Sirera P., Marín L., Fernández L., Torrent V.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. pausisi@alumni.uv.es.

Un teratógeno es cualquier agente que puede producir una alteración permanente en el desarrollo embrionario o fetal, pudiéndose producir una malformación. La alteración puede ser directa o indirecta. Existen algunos fármacos que pueden alteran el desarrollo fetal. Por ello, el objetivo de este trabajo es realizar un estudio para evaluar la seguridad de los fármacos que pueden causar efectos teratógenos. Para ello se ha realizado una revisión bibliográfica sobre los efectos teratogénicos que ciertos fármacos pueden causar, utilizando bases de datos tales como el PubMed y Web of Science, así como la web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Del estudio realizado, se seleccionan 4 fármacos con efectos teratógenos que son de uso común en la actualidad (warfarina, misoprostol y ácido valproico) o lo fueron durante los años 50-60 (talidomida). Para evaluar la seguridad de dichos fármacos, se estudia su acción farmacológica, incidiendo sobre el mecanismo teratogénico de cada uno de ellos y destacando las malformaciones fetales producidas, como son la focomelia en el caso de la talidomida; el punteado de las epífisis con la warfarina; el síndrome de Moebius con el misoprostol y; la espina bífida y el labio leporino, entre otros, en el ácido valproico. Por tanto, debido a los graves efectos teratogénicos que pueden causar ciertos fármacos de uso común, los profesionales sanitarios y las mujeres gestantes debería considerar el tipo de tratamiento a seguir en determinadas situaciones para evitar la posibilidad de producir alteraciones en el feto.

Palabras claves: ácido valproico, misoprostol, talidomida, teratogénesis, warfarina.

C4) EFECTOS TÓXICOS DE LA MIRISTICINA COMO COMPONENTE DE LA NUEZ MOSCADA.

Sanchis C., Láinez S., Sánchez C., Juan-García A.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

La nuez moscada es una semilla procedente de la familia *Myristicaceae*, generalmente utilizada como especia aromática. Uno de los componentes del aceite esencial de la nuez moscada, es la miristicina (8%). Debido a esta sustancia, la nuez moscada está clasificada dentro del grupo de estupefacientes y narcóticos, así como con efectos hepatotóxicos en elevadas dosis. Aunque no existe legislación para la nuez moscada, ni para la miristicina, sí se han establecido cantidades recomendadas en base a diferentes estudios realizados, y se recomienda un máximo de 6g/día pero empleando dosis que no superen 1g.

En este trabajo bibliográfico, se recogen estudios realizados con la miristicina tanto *in vivo* como *in vitro* en los últimos diez años, con el fin de conocer los efectos tóxicos y contrastarlos con sus efectos beneficiosos. En este sentido, se sabe que de la nuez moscada presenta propiedades beneficiosas como: capacidad antibacteriana, estimulante en algunas afecciones en el SNC, antirreumático, oxitócico, antioxidante e imunomodulador; pero también presenta efectos adversos como neurotoxicidad a dosis elevadas, propiedades psicoactivas, alteración de la percepción, inhibición sobre las MAO, entre otros. Si bien, la sintomatología asociada a la intoxicación por miristicina desaparece transcurridas las 2-6h tras la ingesta y la recuperación se produce, normalmente, a las 24h.

Las investigaciones más recientes revelan su afectación nula como genotóxico así como en la modulación de los receptores GABA, aunque sí como apoptótico y promotor de ansiogénesis.

C5) PAPEL DEL PROFESIONAL EN FARMACIA ANTE LAS ALERTAS FARMACÉUTICAS.

Gómez C., Hernández M., Marcos A.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Ante la necesidad de ofrecer una atención farmacéutica adecuada a los pacientes se establece un sistema de notificaciones (alertas farmacéuticas). El sistema Español de Farmacovigilancia es una estructura descentralizada (en 17 centros autonómicos), coordinada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), y encargada de procesar la información sobre sospechas de reacciones adversas de medicamentos (RAM) para identificar riesgos previamente no conocidos o cambios de riesgos ya conocidos. Cualquier persona (personal sanitario o ciudadano) puede notificar a través de la web (https://www.notificaram.es/) o mediante el programa

de notificación espontánea, conocido como Tarjeta Amarilla. El objetivo de este estudio es analizar la relación riesgo/beneficio de algunas alertas farmacéuticas y valorar la intervención que debe hacer el farmacéutico con dichos medicamentos cuando están pautados en pacientes de riesgo para evitar las RAM. Para ello, se hace un estudio exhaustivo de las alertas proporcionadas por la AEMPS y se seleccionan 3 notificaciones sobre alertas farmacéuticas emitidas en los últimos años consideradas de especial interés por el papel que puede ejercer el farmacéutico con el paciente. Los resultados observados demuestran que en los casos en los pueda existir un riesgo para el paciente a causa del medicamento, se adoptan diferentes medidas cautelares, tales como incluir una advertencia, cambiar las condiciones de uso, la autorización o suspensión temporal o definitiva de su comercialización. La información de estas alertas va dirigida a las autoridades competentes, la industria farmacéutica, los distribuidores, profesionales de la salud y los pacientes. De este estudio, se concluye que con la Farmacovigilancia en España se informar sobre las alertas farmacéuticas tanto por profesionales sanitarios como de la población en general y contribuye a disminuir la morbilidad producida por las RAM que pasan desapercibidas de manera frecuente.

Palabras Clave: alerta farmacéutica, AEMPS, farmacovigilancia.

C6) NUEVAS DROGAS DE DISEÑO: TOXICIDAD DE LA DROGA CANIBAL.

Gutiérrez S., Frontera R., Torres J., Rodríguez I.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. E-mail del primer autor: salgui@alumni.uv.es.

Una nueva droga de diseño, la *3.4-METILENDIOXIPIROVALERONA* (MDPV), popularmente conocida como la "Droga caníbal" sigue provocando numerosas intoxicaciones, extendiéndose principalmente en el colectivo adolescente. Su incremento en el consumo puede explicarse por la facilidad de obtención, la pureza con la que se puede obtener y los efectos que produce. La MDPV se obtiene de las hojas de Catha edulis, que contiene catinona, su precursor sintético. La MDPV se clasifica dentro de las drogas tipo anfetaminas, ya que su mecanismo toxicológico es prácticamente idéntico; es por ello, que su gran toxicidad ha implicado la aparición de numerosas investigaciones en el ámbito de la toxicidad que inducen. Para determinar los efectos tóxicos de la MDPV se ha realizado una revisión bibliográfica sobre la exposición aguda del MDPV en el hombre, los efectos que produce, los estudios experimentales realizados y los resultados se comparan con otras drogas cuyo mecanismo de acción es similar. Tras la evaluación de los artículos, se puede concluir, que su toxicidad se produce especialmente por una activación simpática excesiva, dando lugar a procesos como taquicardia, midriasis, que induce a visión borrosa y diaforesis, entre otros. Sin embargo, lo que más destaca es su efecto neurotóxico, dando lugar a alteraciones mentales tales como agresividad, pérdida de memoria, conductas estereotipadas, etc. Lo más destacable a nivel celular es que en determinados estadios de la vida, puede inducir apoptosis neuronal por procesos como estrés oxidativo y daño mitocondrial. El tratamiento más habitual que se les administra a las personas intoxicadas por MDPV son ansiolíticos potentes como benzodiacepinas, o neurolépticos mayores. Estudios epidemiológicos desarrollados con esta sustancia demuestran que, pese al poco tiempo que se está comercializando ilegalmente, ya hay más de un millar de casos de intoxicaciones en humanos, muchos de ellos con desenlaces fatales como la muerte. Para finalizar el estudio, se realizó una revisión sobre los avances en el conocimiento de este tipo de sustancias que van apareciendo, para poder comprender los mecanismos de acción, dosis que producen efectos tóxicos y así poder evaluar su alto poder toxicológico y entender su farmacología, con el objetivo de poder concienciar a la población sobre los riesgos que suponen la exposición a la MDPV.

Palabras clave: MDPV; Catha edulis; toxicidad.

C7) EFECTOS TÓXICOS POR EL CONSUMO DE KROKODIL.

Heskouri H ., Muñoz E., Gómez JM., Tejedor F.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. 1hebenhes@alumni.uv.es.

El consumo de las drogas ilícitas aumenta continuamente en todo mundo. En 2007 la National Surveyon Drug Use and Health estimó en 208 millones de personas consumidoras de este tipo de sustancias adictivas. El objetivo de este estudio es realizar una revisión bibliográfica sobre los efectos tóxicos del krokodil, también llamada desomorfina o heroína caníbal, haciendo uso de diferentes bases de datos tales como Pubmed y ScienceDirect. Los resultados obtenidos demuestran que el krokodil o desomorfina, análogo semisintético de la morfina, es tres veces más tóxica que ésta y que se puede obtener con relativa inmediatez aunque suele presentarse de manera muy impura. El consumo de krokodil produce: úlceras, flebitis, gangrena, infecciones de la piel y tejidos blandos hasta llegar al hueso, así como daño cerebral pudiendo provocar la muerte en consumidores habituales en menos de dos años. Por su gran poder adictivo, por el fácil acceso a los productos y por el hecho de que a día de hoy no existe cura para su intoxicación, al krokodil actualmente se la considera una de las peores drogas creadas sintéticamente. Por lo tanto, es necesaria tanto la concienciación en la población de los riesgos de su consumo, como el control de su síntesis y consumo ilegal.

Palabras clave: Desomorfina, krokodil, heroína caníbal, efectos tóxicos.

C8) INTOXICACIÓN POR CONSUMO DE BURUNDANGA.

Muñoz E., Heskouri H ., Gómez JM., Tejedor F.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. 1emuher@alumni.uv.es.

Desde hace muchos años se conoce la toxicidad de extractos derivados de plantas como estramonio (Datura stramonium), mandrágora (Mandragora officinarum) o brugmansia (Brugmansia candida) de la familia Solanaceae. A comienzos de los años ochenta se empezó a utilizar la escopolamina pura, alcaloide tropánico con actividad anticolinérgica. Recientemente el uso de estas plantas se ha asociado con el consumo de tranquilizantes como benzodiacepinas y fenotiacinas, para evitar la agitación psicomotora y dar lugar a lo que actualmente se conoce como "nueva burundanga". El objetivo de este trabajo es la realización de una revisión bibliográfica sobre la burundanga y la escopolamina utilizando diferentes bases de datos, tales como PubMed o ScienceDirect. Los resultados obtenidos demuestran que tras la intoxicación por burundanga se produce un cuadro clínico que presenta efectos causados a nivel del sistema nervioso periférico tales como: midriasis, taquicardia, sequedad bucal, visión borrosa, retención urinaria; además de sus efectos a nivel del sistema nervioso central que producen: amnesia anterógrada, desorientación, incoordinación en los movimientos, alucinaciones, inhibición de la voluntad, estupor y coma. Debido a los efectos tóxicos que presenta y su uso habitual como droga, es necesario un mayor control de su uso y una mejor concienciación de sus efectos en la población.

Palabras clave: Burundanga, escopolamina, efectos tóxicos.

C9) IMPACTO TOXICOLÓGICO DEL EMPLEO DE DDT PARA ERRADICAR LA MALARIA.

Palanques T., Colomer C., Reig C., Zurriaga M.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València. topapas@alumni.uv.es.

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa causada por el trofozoíto del género *Plasmodium*, la cual se caracteriza por ataques

intermitentes de fiebre muy alta y se transmite principalmente por la picadura del mosquito *Anopheles* hembra. Esta enfermedad tiene una elevada mortalidad, pues causa alrededor de un millón de muertes anuales, de hecho, actualmente se produce una muerte por malaria cada cuatro minutos. La aplicación de los insecticidas organoclorados, concretamente el DDT, a partir del año 1940, ha hecho que disminuya la mortalidad de la malaria. Este plaguicida fue considerado como un arma perfecta, debido a que se pensó que tenía una gran selectividad por el mosquito *Anopheles* y que no tenía efectos dañinos sobre las demás especies. Sin embargo, evidencias científicas demostraron su potencial tóxico. Su mecanismo de acción produce liberación de acetilcolina, por lo que en intoxicaciones agudas por DDT aparecen síntomas convulsivos y temblores; también produce toxicidad crónica, concretamente sobre el hígado causando hepatopatías, e interfiere con el ADN pudiendo llegar a producir mutagénesis. Estos efectos se ven acentuados por su gran estabilidad y persistencia, ya que es un compuesto altamente lipófilo y su eliminación es lenta. Además, se biotransforma a metabolitos también tóxicos que prolongan su efecto dañino. Asimismo, el DDT es un disruptor endocrino, por lo que altera el comportamiento sexual y la fisiología (principalmente de peces y aves). Este insecticida fue ampliamente utilizado pero se prohibió su uso por los efectos negativos que presenta para la salud a largo plazo. Por otra parte, el vector de la malaria desarrolló mecanismos de resistencia al DDT provocando una disminución de la efectividad, como son la alteración del sitio diana, el incremento del metabolismo enzimático y la disminución de la penetración del tóxico a través de la cutícula. Su retirada del mercado conllevó a graves consecuencias puesto que se incrementó el número de casos de malaria y reapareció en zonas donde prácticamente se había erradicado. Por lo cual, se optó por reintroducir el DDT para el control vectorial de la enfermedad de forma regulada mediante tratados y convenios que legislan su uso. En la actualidad, la alternativa más usada en la lucha antivectorial son los piretroides. Las mosquiteras impregnadas con piretroides podrían evitar cerca del 50% de casos de malaria en niños y mujeres embarazadas, aunque solo sea utilizado por un 10% de la población, bien por falta de conocimientos o por motivos económicos. Aun así, dicho método resulta menos efectivo que el DDT. También han sido utilizadas diferentes estrategias basadas en pesticidas combinados para evitar el desarrollo de resistencias por parte de los anofelinos e incrementar la efectividad de los insecticidas. Hoy en día, las principales líneas de investigación en este ámbito van dirigidas principalmente a la búsqueda de nuevas soluciones que resulten más efectivas y seguras que las utilizadas hasta el momento, como son el empleo de métodos biológicos, los cuales van destinados a evitar la cría del mosquito o a interrumpir su ciclo mediante el uso larvicidas microbianos.

Palabras clave: DDT, toxicidad, resistencia, medidas alternativas.

TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

Comunicaciones orales.

Moderadora: *Dra. Houda Berrada Ramdani.*

O1) EMPLEO DE ALIL-ISOTIOCIANATO COMO CONSERVANTE FRENTE AL HONGO MICOTOXIGÉNICO *ASPERGILLUS PARASITICUS.*

Saladino F., Quiles JM., Manyes L., Meca G., Fernández M.
Laboratorio de toxicología. Departamento de Medicina Preventiva i Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Las aflatoxinas (AFs) son compuestos altamente tóxicos producidos por el metabolismo secundario de algunos hongos filamentosos del genero *Aspergillus* spp, como *A. parasiticus* y *A. flavus*. Estas micotoxinas están consideradas como carcinogénicas con evidencia probada en humanos (Grupo I) por la IARC (International Agency for Researchon Cancer) y pueden encontrarse contaminando alimentos como frutos secos, cereales y derivados. El alil-isotiocianato (AITC) es una sustancia volátil con elevado poder antifúngico presente en vegetales mayoritariamente del orden *Brassicales*. En el siguiente estudio se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Fungicida Mínima (MFC) del AITC frente al hongo *A. parasiticus* CECT 2681 en medio liquido. A continuación se evaluó el efecto de dos concentraciones de esta sustancia (1 y 5 □L por L de aire envasado) y dos formas de exposición (rápida y prologada) en masas de pizza artesanales inoculadas con 50 □L de una suspensión del hongo *A. parasiticus* CECT 2681 en medio liquido y conservadas a 4 ºC en envases de plástico de 250 mL. Para ello se llevo a cabo un recuento en placas del hongo a 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas, así como de las bacterias totales y bacterias lácticas. Por último se analizó la concentración de AFs en esas mismas muestras transcurridas las 6 semanas mediante extracción con metanol-agua (60:40) y determinación por LC-MS/MS. Los resultados de la MIC y la MFC fueron de 20 y 50 □L/L respectivamente. Al final del tratamiento se observó una reducción en el crecimiento del hongo entre 0,13 y 1,90 Log, una reducción del crecimiento de bacterias entre 0,09 y 1,92 Log y una reducción del crecimiento de bacterias lácticas entre 0,10 y 1,05 Log. La reducción en la formación de AFs fue coincidente con la inhibición del hongo y resultó variable entre el 40 y el 100%.

Palabras clave: Aflatoxinas, Alil-isotiocianato, *Aspergillus parasiticus*.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-43194-P) F. Saladino agradece la beca “Santiago Grisolía” concedida por la Consellería de Educación de la Comunidad Valenciana.

O2) DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE MICOTOXINAS EMERGENTES DE *FUSARIUM* EN PASTA.

Serrano AB., Ferrer E.
Laboratorio de Toxicología. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal. Facultat de Farmàcia. Universitat de València.

Las micotoxinas emergentes de *Fusarium* (eniatinas, beauvericina, moniliformina y fusaproliferina) son sustancias tóxicas presentes de forma natural en los alimentos, especialmente en cereales y productos derivados, frutos secos y piensos (Santini et al., 2012). Estudios de toxicidad *in vitro* han evidenciado que estas micotoxinas pueden causar inmunotoxicidad, inhibición enzimática e inducción del estrés oxidativo (Prosperini et al., 2013). Recientemente, el Panel de Contaminantes en la Cadena Alimentaria de la EFSA (European Food Safety Authority) ha emitido una Opinión Científica proporcionando una serie de recomendaciones para evaluar los riesgos para la salud humana y animal asociados a las eniatinas (ENs) y beauvericina (BEA), incluyendo la realización de estudios acerca del comportamiento de estos compuestos durante la preparación de alimentos a base de cereales (EFSA CONTAM Panel, 2014). En el presente estudio se han propuesto dos objetivos: en primer lugar, la evaluación del comportamiento de las ENs durante el cocinado de la pasta, y en segundo, desarrollar una estrategia para reducir los niveles de ENs durante la cocción de la pasta mediante la modificación del pH en el agua de cocción. El análisis en las muestras de pasta seca y pasta cocida se realizó mediante Extracción Sólido-Líquido, y en el agua de cocción por Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva. La detección y cuantificación de las micotoxinas se llevó a cabo por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en tándem.

El efecto del tratamiento térmico dio lugar a reducciones del 94-100% en el contenido de ENs tipo A, mientras que las reducciones fueron del 14-65% para las ENs tipo B. Sin embargo, cuando se empleó agua de cocción a pH ácido para realizar el tratamiento, las reducciones alcanzaron el 100%. El efecto del pH básico dio lugar a reducciones del 44-100% dependiendo del tipo de micotoxina. Por tanto, de este estudio se concluye que la estrategia de cocinado a pH ácido es un eficiente protocolo para reducir el nivel de ENs en el alimento listo

para consumir.

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación para la realización del presente estudio (AGL2013-43194-P). A. B. Serrano agradece la beca FPI (BES-2011-045454) proporcionada por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Palabras clave: micotoxinas, cocción pasta, pH, LC-MS/MS.

O3) ESTUDIO DE OCRATOXINA A EN CAFÉ: DEL CAMPO A LOS CONSUMIDORES.

García A., Ferrer E.
Laboratorio de Toxicología. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Ochratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por hongos filamentosos del genero *Aspergillus* en zonas tropicales que presenta toxicidad a nivel renal (Sugita et al., 2013). El café es un producto alimentario susceptible de presentar contaminación por OTA. Los granos del café son procesados en varias etapas desde la recolecta hasta la ingesta (fermentación, tostado y preparación para el consumo). En España se consumen 1.3kg de café por habitante al año. La unión Europea ha establecido niveles máximos de OTA en café tostado (5.0µg/kg). La JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ha establecido una ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) de 112ng/kg.pc/semana. Los objetivos del presente estudio fueron: el análisis del contenido de OTA en café verde, café tostado, y bebida de café; evaluación del efecto del tostado en los contenidos de OTA; y evaluación del riesgo de OTA por consumo de café. Para ello se analizaron 107 muestras (4 de café verde, 103 de café tostado). Las muestras de café tostado fueron procesadas en el laboratorio mediante cafetera tradicional (n=53) y mediante máquina de capsulas monodosis (n=50). El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). La evaluación del riesgo se realizó siguiendo las recomendaciones del "*Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed*". Los resultados mostraron concentraciones medias de OTA de 1.82, 4.31. y 1.98 µg/kg en café verde, tostado y bebida respectivamente. El procesado de café tostado produjo una reducción en los contenidos de OTA del 46%. La cafetera tradicional resultó más eficiente en la reducción de OTA (38%) que la máquina de capsulas monodosis (49%). La ingesta diaria estimada de OTA por consumo de café fue de 4.38x10-2 ng/kg.pc/día. El consumo de café representa el 0.27% de la PTWI de OTA.

Este trabajo forma parte de un trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2013/43194/P.

Palabras clave: evaluación del riesgo, ocratoxina A, café procesado.

O4) ANÁLISIS DE MICOTOXINAS EN PIENSOS PARA RATAS DE LABORATORIO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Escrivá L., Font G., Puchuri D., Manyes L.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

La composición y calidad de los piensos determina el estado de salud, rendimiento y metabolismo de los animales de experimentación, y es esencial para la obtención de resultados consistentes, mejora de la reproducibilidad y estandarización, disminución de la variabilidad interidividual y reducción del número de animales necesarios en la experimentación animal. Debido a su composición, los piensos son particularmente vulnerables a la contaminación por micotoxinas que pueden originar efectos tóxicos como la reducción de la ingesta de alimento y alteraciones de los sistemas neurológico, hepatotóxico e inmunológico. Muy pocos estudios abordan la contaminación por micotoxinas en piensos destinados a animales de laboratorio.

El objetivo de este estudio es (i) desarrollar un método para la determinación de 12 micotoxinas (eniatinas A, A1, B, B1; aflatoxinas B1, B2, G1, G2; ocratoxina A; zearalenona; y toxinas T-2 y HT-2) en piensos y (ii) analizar piensos comerciales generalmente utilizados para la alimentación de ratas de laboratorio.

El método fue validado con éxito mostrando recuperaciones satisfactorias (73,3%-111,6%), buena precisón intradía (<10%) e interdía (<13%) y límites de detección y cuantificación menores de 5 y 15 ng/g, respectivamente. El método validado se aplicó a 10 muestras pienso comercial para ratas de laboratorio adquiridos de diferentes centros de investigación de España, mostrando contaminación por micotoxinas en algunos de ellos.

Es necesario controlar la calidad de los piensos destinados a la alimentación de animales de laboratorio, altamente susceptibles a la contaminación por micotoxinas, que pueden afectar a los resultados de los ensayos *in vivo*, así como a la salud de los animales.

Este trabajo forma parte de un trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2013-43194-P.

Palabras clave: micotoxinas, piensos, CL-EM/EM.

Comunicaciones tipo cartel.

C1) ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS PRODUCIDO POR BACTERIAS PROBIÓTICAS.

Luz C., Manyes L., Meca G.
Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología de la Facultat de Farmàcia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s / n, 46100 Burjassot, España carluz@alumni.uv.es.

El deterioro de los alimentos producido por hongos micotoxigénicos representa un problema importante en la seguridad alimentaria. Encontramos un gran número de productos alimentarios, incluyendo los piensos en los que se emplean bacterias lácticas como cultivos iniciadores. Durante la fermentación además de producir ácido láctico y acético, algunas cepas producen otros compuestos con importante actividad antifúngica como son otros ácidos orgánicos, péptidos y ácidos grasos. En este estudio 25 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) proporcionados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), se cultivaron en medio líquido de caldo MRS durante 2 y 7 días a 37 °C en condiciones anaeróbicas. Después los medios líquidos fermentados se concentraron en atmósfera de nitrógeno, se filtran y se realizaron las pruebas antifúngicas frente *Aspergillus parasiticus* (productor de aflatoxinas) y *Penicillium expansum* (productor de patulina) utilizando el ensayo de Kirby-Bauer (método antibiograma). También se estudiaron las propiedades antifúngicas del líquido intracelular extraído con metanol utilizando la misma metodología. A 48h de incubación sólo los extractos extracelulares (EE) de 4 cepas fueron activos contra *Penicillium expansum*, mientras que a los 7 días de incubación 5 EE de diferentes cepas inhibieron el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium expansum*. En cuanto a los extractos intracelulares sólo la cepa de *Lactobacillus plantarum* inhibió el crecimiento de las dos cepas micotoxigénicos en estudio. Otras ensayos que se desarrollarán en el futuro se centrarán en el aislamiento e identificación de los compuestos antifúngicos producidos por LAB utilizando técnicas cromatográficas como cromatografía líquida (CL) con detector de diodos (DAD) y la CL acoplado a la espectrometría de masas en tándem (EM/EM).

Palabras clave: Bacterias lácticas, compuestos antifúngicos, bioconservación, Kirby-Bauer.

C2) EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A DEOXINIVALENOL EN NIÑOS A TRAVÉS DE UN BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN.

Rodríguez Y., Berrada H.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

La evaluación de la exposición a micotoxinas se ha evaluado tradicionalmente combinando datos de contaminación y consumo. No obstante, para una mayor aproximación a la exposición real se propone la monitorización de sus biomarcardores de exposición en orina. En este estudio preliminar (48h) se investigó la presencia de deoxinivalenol (DON), expresado como la suma de su forma libre o sin metabolizar y la de sus conjugados glucuronados como consecuencia de su metabolismo, en la orina 24h de dos niños (7-9 años). Para ello se llevó a cabo una hidrólisis enzimática de las orinas con una solución de β-glucuronidasa seguido de una extracción líquida-líquida asistida por sales y posterior determinación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem. Entre 6-8 muestras de orina (50 mL) se recogieron cada día de ambos participantes y una alícuota (1 mL) de cada muestra se utilizó para su posterior determinación. Se detectó DON total a niveles de 10,8 µg y 16,0 µg en las orinas del participante 1 y 2, respectivamente. Asumiendo un volumen diario de orina de 1 L y un ratio de excreción de DON del 72% [1], se estimó una ingesta probable de DON y se expresó en base a peso corporal de los individuos. Esta ingesta calculada representó el 33% y el 49% de la ingesta diaria tolerable máxima provisional establecida para el DON (1 µg/kg p.c.) para el participante 1 y 2, respectivamente. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la exposición a DON aunque a valores que no supondrían un motivo de preocupación toxicológica. Pese a ello, se propone una continua monitorización de sus niveles, especialmente en grupos de población susceptible.

Palabras Clave: Deoxinivalenol, orina, evaluación de la exposición, biomarcadores.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de un trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL 2013/43194/P. Rodríguez-Carrasco Y agradece al Ministerio de Educación la ayuda predoctoral F.P.U. (AP2010-2940).

C3) ANÁLISIS DE MICOTOXINAS EMERGENTES EN LA BEBIDA DE TÉ E INFUSIONES MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO/LÍQUIDO DISPERSIVA.

Pallarés N., Ferrer E.
Laboratori de Toxicologia. Departament de Medicina Preventiva y Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Av Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot.

El término micotoxinas se refiere a una variedad de compuestos altamente tóxicos resultado del metabolismo secundario de origen fúngico. Las micotoxinas originan en los organismos diana efectos biológicos diversos como: hepatoxicidad, nefrotoxicidad, actividad inmunosupresora, mutagenicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad, estrogenicidad y acción diabetógena. Las especies fúngicas toxigénicas que se encuentran con mayor frecuencia en los alimentos pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Marín et al., 2013). *Fusarium* produce las denominadas micotoxinas emergentes de las que existen datos limitados, debido a la tardía comprensión de su papel como micotoxinas. Dentro de estas, las Eniatinas (ENNs) y la beauvericina (BEA) son micotoxinas citotóxicas (Juan-García et al., 2013). El té y las infusiones de hierbas son productos cuyo consumo por la población ha aumentado en los últimos años debido a los posibles beneficios sobre la salud de los productos naturales. Diferentes estudios han evaluado la presencia de hongos micotoxigénicos en té, infusiones de hierbas y plantas medicinales (Monbaliu et al., 2010). Así el té negro, verde o semifermentado y las infusiones de hierbas, especialmente si son almacenados en condiciones inapropiadas, pueden estar sujetos al incremento de los niveles de hongos y de micotoxinas. La mayoría de estudios en tés e infusiones han tratado sobre la presencia de Aflatoxinas (AFs), Fumonisinas (FBs), Ocratoxina A (OTA) y Zearalenona (ZEA) (Monlabiu et al., 2010; Bokhari & Aly 2013; Haas et al., 2013), pero hay muy poco información sobre la presencia de micotoxinas emergentes, que solo han sido estudiadas en plantas medicinales (Hu & Rychlik, 2014). Por otra parte, hay muy pocos estudios que traten sobre la presencia de micotoxinas en la bebida del té y las infusiones ya listas para el consumo, que es la forma a la que está directamente expuesta la población (Monlabiu et al., 2010). En este contexto, el objeto del presente trabajo es evaluar la presencia de micotoxinas en la bebida del té y las infusiones y especialmente de las micotoxinas emergentes. Para ello, se ha puesto a punto un método mediante microextracción Liquido/liquido dispersiva (DLLME), en la que el disolvente empleado ha sido una mezcla de Acetonitrilo (ACN) y Tetracloruro de Carbono en una proporción (950/620 µl) respectivamente y la determinación se ha llevado a cabo por Cromatografía Líquida-Espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) con trampa de iones (IT). Los parámetros analíticos hallados hasta el momento (recuperaciones, efecto matriz, límites de detección y cuantificación) son acordes a lo estipulado por la Regulación de la Comisión Europea (EC 657/2002).

Palabras clave: micotoxinas emergentes, bebida de té, infusiones de hierbas, análisis.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de un trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL 2013/43194/P.

C4) DETERMINATION OF AFLATOXINS, OCHRATOXIN A AND ALTERNARIA MYCOTOXINS IN RAW AND PRODUCTS FRUITS BY QUECHERS EXTRACTION METHOD AND LC-MS/MS.

Juan C., Cioffi D.
Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l´Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Pencillium* and *Alternaria* are major contributors to fruit spoilage. The mycotoxins most commonly associated with fruit are patulin, aflatoxin, *Alternaria* toxins and ochratoxin A. Factors known to affect their production include the fruit type and cultivar, geographical location, climate, pre-harvest treatments, method of harvest, post-harvest treatments and storage conditions.Despite efforts to control fungal contamination of foods, mycotoxin producing fungi are ubiquitous contaminants of nature and make their way into fruit in the field or orchard and at any time during harvesting, processing, storage and marketing. Mycotoxins can be present in fresh fruits and also in products such as juices, wines and marmalade. Efforts have been made to develop analytical methods for detecting aflatoxins, *Alternaria* compounds and ochratoxin A in different fruit matrixes (berries, grapes and apples) and products. Furthermore, their analyses are very important for their quality control and to protect consumers from the exposure to this mycotoxin, in fact reliable analytical methods for rapid, sensitive and accurate determination of them in fruits and products are required. Therefore, an analytical method to determinate aflatoxins (aflatoxin- B1, aflatoxin-B2, aflatoxin-G1 and aflatoxin-G2), *Alternaria* toxins (alternariol, alternariol methyl ether and altenuene) and ochratoxin A in raw berries and marmalade berries have been developed and optimized. Sample extraction and purification were performed with a QuEChERS-based procedure and determined by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) detection. The validation was performed by analyzing recovery samples at three different spiked concentrations, 65, 130 and 260 µg/kg, with three replicates (n = 3) at each concentration. Recoveries ranged from 74% to 124% and the intra-day precision and inter-day precision, expressed as relative standard deviation, were lower than 13% and 15%, respectively for all studied compounds. Limits of quantification (LQ) were lower than 15 µg/kg for all studied mycotoxins. Five concentration levels were used for constructing the calibration curves which showed good linearity between LQ and 100 times LQ concentration levels (linear range). Matrix-matched calibration for applying the method in routine analysis is recommended for reliable quantitative results.

Keywords: Aflatoxins, ochratoxin A, alternariol, fruit, marmalade.

Acknowledgements: This research has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2013/43194/P).

C5) REDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE AFLATOXINAS EN PAN DE MOLDE MEDIANTE EL USO DE ALIL ISOTIOCIANATO Y ALDEHÍDO CINÁMICO.

López M., Saladino F., Meca G., Fernández M.
Laboratorio de toxicología. Departamento de Medicina Preventiva, Facultat de Farmàcia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot (Valencia).

Las micotoxinas, metabolitos secundarios de los hongos, son perjudiciales para la salud ya sea por vía inhalatoria, contacto con la piel o ingestión. Las aflatoxinas (AFs) son micotoxinas producidas por los hongos *Aspergillus flavus y A. parasiticus* y contaminan generalmente cereales y frutos secos. El Alil isotiocianato (AITC) es un derivado de la sinigrina, glucosinolato que se encuentra en las plantas de la familia *Brassicaceae,* y es conocido como un potente agente antimicrobiano. El aldehído cinámico (CA), principal componente de la canela, también se le conoce como un agente antimicrobiano natural, ambas sustancias están consideradas seguras para su uso en alimentos. El objetivo del estudio fue evaluar la reducción de la producción de AFs producidas por *A. parasiticus* en pan de molde mediante la exposición a AITC y CA y observar si hay un efecto sinérgico entre ambos. El pan se realizó siguiendo una receta tradicional, posteriormente se inocularon las rebanadas con una suspensión de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 en medio líquido, se envasaron en bolsas de plástico de atmosfera modificada y se cerraron, se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el día de la extracción. Los distintos tratamientos se realizan pegando tiras de papel de filtro con los patrones dentro de las bolsas de forma que los compuestos migran al espacio de cabeza. Para hacer la extracción las rebanadas se trituraron, se pesaron en falcon y se añadió metanol, se homogeneizó mediante ultraturrax, se centrifugó y a continuación se evaporó el sobrenadante en rotavapor, se redisolvieron las muestras con metanol y se volvió a evaporar con corriente de nitrógeno en turbovap. El residuo se resuspendió con metanol, se filtró y se vializó para su análisis por cromatografía liquida acoplada a detector de espectrometría de masas en tándem (CL-MS/MS). No se observó crecimiento de *A. parisiticus* en los tratamientos con AITC (5 ppm), CA (100 ppm) y en la sinergia AITC-CA (2,5-50; 5-100 ppm), mientras que si se apreció en los controles y en los tratamientos AITC (2,5 ppm) y CA (50 ppm). Se ha obtenido una reducción promedio para todas las AFs de entre el 79,1 y el 100%, siendo el AITC más efectivo que el CA.

Palabras clave: Aflatoxinas, alil isotiocianato, aldehído cinámico.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013/43194/P).

C6) HISTAMINA, PUTRESCINA, CADAVERINA Y TIRAMINA: AMINAS EN ALIMENTOS DE CONSUMO HABITUAL.

Blanco V, Moret R, Vela R, Juan-García A.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular que se generan debido a la descarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. Se encuentran formando parte de alimentos de origen vegetal de forma endógena (aguacate, plátano, vino…) y también en alimentos de origen animal (pescado, carne, queso) como consecuencia de la acción microbiana durante el proceso de almacenamiento de los propios alimentos. La concentración de las distintas aminas en los alimentos varía, incluso dentro de un mismo alimento, dado que dichas concentraciones se ven influenciadas por las condiciones en las que se encuentra el alimento. Todas las aminas biógenas están relacionadas con las funciones neuromoduladoras, y están asociadas estructural y funcionalmente a las catecolaminas. Se cree que están implicadas en trastornos tales como la esquizofrenia, la depresión, el trastorno de déficit de atención, enfermedad de Parkinson, vasoconstricción e hipertensión transitoria y aumento de la frecuencia cardíaca. En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de las aminas más estudiadas en los últimos 15 años (2005-2015): histamina, putrescina, cadaverina y tiramina. Su presencia en alimentos así como la concentración de las mismas varía según se concluye de la revisión como sigue: a) la histamina se encuentra principalmente en pescado congelado y en queso rallado (500-600 mg/Kg); b) la putrescina en pescado en conserva y en queso, sobretodo queso Brie, Manchego, Parmesano y rallado; c) la cadaverina en chorizo y salchichón (350-650 mg/Kg); y por último, d) la tiramina está presente en mayor cantidad de alimentos como chorizo, salchichón, fuet, sobrasada, queso rallado y pescado en conserva (500-750 mg/Kg).La cantidad de aminas en el organismo de cada persona varía según la frecuencia de consumo de los alimentos, lo que hace que resulte difícil establecer una legislación que incluya valores límites de cada amina.

Palabras Clave: aminas biógenas, putrescina, histamina, cadaverina, tiramina.

C7) CONTROL DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA EN ALIMENTACION ANIMAL.

Altur M., Juan-García A.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

La alimentación animal tiene una influencia directa sobre la calidad y seguridad de los alimentos de origen animal. Los consumidores de carne, leche, pescado y huevos esperan que la industria y los distribuidores les suministren productos seguros y de alta calidad; para ello los animales están alimentados con piensos nutritivamente equilibrados y formulados conforme a las exigencias fisiológicas del animal (Gorrachategui, 1998). La industria de piensos para animales debe garantizar un control fiable y eficaz del proceso de producción en todos los estadíos y detectar todos los posibles peligros, biológicos, químicos o físicos que pueden estar presentes en las materias primas (cereales y derivados) y en el producto acabado (piensos) (Acebo-Rico 2001). Con el objetivo de conseguir un producto seguro a partir de un proceso seguro y teniendo siempre en cuenta que el riesgo cero no existe, en este trabajo se recogen los diferentes análisis tanto de composición como microbiológicos, llevados a cabo en una empresa de alimentos para animales durante un periodo de tres meses consecutivos. En cuanto al análisis de composición, se llevó a cabo la comprobación de la composición nutricional, determinación de la materia mineral y se analizó la posible contaminación por residuos de antimicrobianos en piensos que no deberían contener medicamentos; mientras que en los parámetros microbiológicos, se analizó la presencia de *Salmonella spp*, *E. coli* y aflatoxinas.

Estos análisis, permiten dentro de la empresa garantizar la inocuidad y calidad de los piensos, teniendo en mente la premisa "del campo a la mesa", manteniendo la trazabilidad de todos los ingredientes y llevando un control durante todo el proceso de producción; así mismo, todos están destinados a conseguir un producto final de calidad y reducir el riesgo de alertas alimentarias por zoonosis o por alimentos contaminados.

Palabras clave: Seguridad alimentaria, calidad y alimentación animal.

C8) PRUEBAS ANALÍTICAS INDUSTRIALES PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS PROCESADOS.

Kravchuk K., Juan-García A.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

La leche líquida es el producto lácteo más consumido en todo el

mundo, pero los productos lácteos procesados están adquiriendo una creciente importancia en muchos países. La diversidad de productos lácteos varía considerablemente entre países debido a los diferentes hábitos alimentarios, las tecnologías disponibles de elaboración de la leche, la demanda de mercado y las circunstancias sociales y culturales. Para la elaboración de productos lácteos procesados se precisa de materia prima de calidad que garantice su idoneidad para obtener el producto final y que éste sea apto para el consumidor. La calidad de esta materia prima se garantiza a través de pruebas analíticas, microbiológicas y cumpliendo siempre la legislación de productos lácteos. En este trabajo se recogen las pruebas analíticas que se llevan a cabo en la industria para la elaboración de diferentes productos lácteos. Por una parte el análisis de la materia prima (leche fresca, leche en polvo, ovoproductos y agua) para la obtención de los productos y por otra del producto final (flanes, natillas, tartas y yogures). En relación a la materia prima se analizan parámetros como pH, ºBrix, acidez, presencia de inhibidores, prueba de alcohol, extracto seco, composición nutricional, capacidad espumante, cloro residual y dureza. Mientras que para el producto final se realiza un control organoléptico a través de una cata y un control microbiológico para asegurar la ausencia, principalmente, de dos microorganismos: *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.

Palabras clave: leche, lácteo, listeria, salmonella.

C9) LOW OCCURRENCE OF PATULIN IN GRAPES IN TUNISIA.

Nidhal Zouaoui1, Houda Berrada2, Slawa Abid-Essefi1, Hassen Bacha1

1-Laboratory for Research on Biologically Compatible Compounds (LRSBC), Faculty of Dentistry, Rue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisia.

2- Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vincent Andrés Estelles, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

Patulin (PAT) is a secondary metabolite, which is mainly produced by certain species of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. Fifty three (53) grape samples were analyzed for PAT content. The objective of this study was to investigate the occurrence of patulin in grapes cultured in Tunisia, to compare the levels of PAT contamination with the European norms. To perform this study, we developed and validated, in our laboratory conditions, an HPLC method for a quantitative analysis of PAT in grapes. PAT concentrations ranging from 1 to 55.42 µg/l was detected in eighteen samples (33.96%) and only one sample exceeds the limit fixed by the European Commission Reg.1881/2006. The results of this study showed that patulin does not seem to be a problem in grapes cultured in Tunisia. Although incidence and levels of patulin found are low, constant surveillance is recommended, since the occurrence of the toxin in grapes is dependent on many factors.

Key words: Patulin, grapes, HPLC, Tunisia.

C10) MICETISMOS CAUSADOS POR LA RECOLECCIÓN TRADICIONAL: MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS MÁS FRECUENTES.

González Medina MA., Romero Puig I., Sánchez López de Andújar A., Berrada H.

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Las setas son cuerpos fructíferos que requieren para su crecimiento un ambiente húmedo y resguardado de la luz. Desde un punto de vista nutricional, no son un alimento primordial en nuestra dieta, sino que han sido incorporados a ella debido a su amplia gama de texturas, aromas y sabores. En España se consumen alrededor de 42 millones de kg de setas al año, entre comercializadas en grandes superficies y una pequeña parte recolectadas a nivel doméstico.

Se han catalogado alrededor de 5000 tipos de setas, de estas, entre 50-70 son tóxicas y de las cuales 5-6 son mortales.La mayoría de los casos de micetismos son causados por confusión de las setas venenosas con especies comestibles, debido al bajo conocimiento que poseen muchas personas en este campo.

En España, se han dado muchos casos de intoxicaciones por setas venenosas. Se estima que anualmente se atienden entre 200 y 400 casos, predominando la afectación gastrointestinal. La intoxicación grave y la mortalidad son poco frecuentes.

En este estudio, se revisan las intoxicaciones debidas a las setas *Entoloma lividum, Gyromitra esculenta* y *Amanita phaloides,* por su elevada incidencia y se relacionan con otras especies aptas para el consumo como *Clitocybe nebularis*, *Morchella esculenta* y *Russula heterophylla.*

Palabras clave: setas venenosas, micetismo y mecanismo de acción.

C11) INTOXICACIONES ALIMENTARIAS POR BIOTOXINAS MARINAS

Chacón Almudéver P., Roig Seguí J., Seguí Rovira R., Berrada H.

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Las intoxicaciones alimentarias por biotoxinas marinas, asociadas a las mareas rojas, constituyen un problema de salud pública a nivel global producido por diferentes especies de algas dinoflageladas que originan intoxicaciones agudas a consecuencia del consumo de peces o moluscos filtradores. Los moluscos más frecuentemente implicados son las almejas, los mejillones y ocasionalmente las vieiras y las ostras. En este grupo se han descrito las intoxicaciones paralizante (PSP), diarreica (DSP), neurotóxica (NSP) y amnésica (ASP) y por azaspirácidas (AZP). El presente trabajo presenta una revisión bibliográfica de las citadas intoxicaciones, estudiando detenidamente cada una de las toxinas responsables, desde su estructura química, mecanismos de acción, síntomas y enfermedades que provocan comparando importancia toixologica e incidencias en diferentes zonas geográficas.

Palabras Clave: Tetrodotoxina, ciguatoxina, saxitoxina, ácido ocadaico, pectenotoxinas, ácido domoico y brevetoxinas.

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Comunicaciones orales.

Moderadora: *Dra. Emilia Ferrer García.*

O1) DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EN GULAS Y SUCEDÁNEO DE GULAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON TRAMPA DE IONES (LC-MS/MS IT).

Tolosa J., Bravo E., Font G., Mañes J., Ferrer E. Área de Toxicología. Facultat de Farmàcia, Universitat de València.

Las micotoxinas son toxinas producto del metabolismo secundario de hongos filamentosos. Contaminan principalmente cereales y otros alimentos (Serrano et al., 2012). En estudios previos se ha determinado la presencia de micotoxinas en piensos destinados a peces de acuicultura, que al ser ingeridas pueden aparecer en el músculo de los animales, pudiendo presentar riesgo para los consumidores (Yiannikouris & Jouany, 2002; Rosa et al., 2009). El objetivo del presente estudio es la determinación de 22 micotoxinas en muestras de gula y sucedáneo de gulas, ya que éstas últimas incluyen en su composición ingredientes susceptibles de contaminación por micotoxinas, empleando para la determinación cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (LC-MS/MS IT). La extracción se lleva a cabo mediante un método Quechers empleando acetonitrilo y agua 50:50 v/v (0,1% ácido fórmico) como disolventes. La determinación cromatográfica se realiza en fase reversa con columna Gemini NX C18 (150 x 2.0 mm, 3 µm) y fases móviles agua y metanol, ambos con 5 mM de formiato amónico y 0,1% de ácido fórmico. El método propuesto se valida de

acuerdo a los criterios de la Comisión Europea 2002/657/CE. Los resultados muestran que un 60% de las 10 muestras de gulas analizadas, presenta contenidos de ZEN, ENB, 15ac-DON y FUS-X del orden de μg/kg. Pese a que las muestras de sucedáneo de gulas incluyen en su composición ingredientes que por sí mismos pueden presentar contaminación micotoxigénica, como harina de trigo, aceite de girasol y proteínas vegetales, entre otros, ninguna de las muestras presenta contenidos de las micotoxinas analizadas, posiblemente debido a la presencia de algunos aditivos que pueden favorecer el paso de las micotoxinas al líquido de conservación presente en el envase.

Palabras clave: Micotoxinas, Gulas, Sucedáneo de gulas, Multimétodo, Cromatografía líquida.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL 2013/43194/P y por la Universitat de València (UV-BI-12-007).

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:
Emilia Ferrer García. Universitat de València
María P. Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 32 (2), 88-171 (2015)
ISSN 0212-7113

REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico

http://aetox.es

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
(Monica.Fernandez@uv.es)
Universitat de València. Valencia

Sección de Métodos Alternativos

Dr. Guillermo Repetto Kuhn
(grepkuh@upo.es)
Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

Sección de Seguridad Alimentaria

Dra. Silvia Pichardo Sánchez
(spichardo@us.es)
Universidad de Sevilla. Sevilla.

Sección de Toxicología Ambiental

Dra. Mª José González Muñoz
(mariajose.gonzalez@uah.es)
Universidad de Alcalá. Madrid.

Sección de Toxicología Clínica

Dr. Tomás Camacho García
(atcamacho@lemabandin.com)
Laboratorios Lema & Bandín. Vigo.

Sección de Toxicología Experimental

Dra. Rosario Moyano Salvago
(r.moyano@uco.es)
Universidad de Córdoba. Córdoba

Sección de Toxicología Forense

Dra. María Luisa Soria Sánchez
(luisa.soria@mju.es)
Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla

Sección de Toxicología Veterinaria

Dr. Antonio Juan García-Fernández
(ajgf@um.es)
Universidad de Murcia. Murcia.

Revista de Toxicología (Editada desde 1983)

Editora:
Dra. Guillermina Font Pérez.
Universitat de València. Valencia
E-mail: Guillermina.font@uv.es

Editoras adjuntas:
Dra. Emilia Ferrer García.
Universitat de València. Valencia
E-mail: Emilia.ferrer@uv.es

Dra. María P. Míguez Santiyán.
Universidad de Extremadura. Cáceres
E-mail: mpmiguez@unex.es