
*GUÍA DE PRÁCTICAS DE
LABORATORIO Y
SEMINARIOS DE
TOXICOLOGÍA
VETERINARIA*



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

EDITADO POR:

Profa. Eva Ramos Alonso
Profa. Paula Moyano-Cires Ivanoff

AUTORES:

Profa. Eva Ramos Alonso
Prof. Javier del Pino Sans
Prof. Alejandro Romero Martínez
Profa. María Jesús Díaz Plaza
Profa. María Teresa Frejo Moya
Profa. Paula Moyano-Cires Ivanoff

ISBN: 978-84-09-32027-1

ÍNDICE:

1. Normas de seguridad y buenas prácticas en el laboratorio

2. Laboratorio de Toxicología

- 2.1. Determinación de amoníaco en muestras de agua.
- 2.2. Determinación de cloruro sódico en pienso y en agua de bebida.
- 2.3. Determinación de arsénico.
- 2.4. Determinación de cianuros.
- 2.5. Determinación de ácido salicílico.
- 2.6. Determinación de nitratos y nitritos.
- 2.7. Determinación de Paraquat y Diquat en muestras de orina.
- 2.8. Determinación de barbitúricos en muestras de plasma sanguíneo por espectrofotometría
- 2.9. Determinación de fenotiazinas en muestras de orina por colorimetría.
- 2.10. Determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en muestras de sangre total.

3. Seminarios de Toxicología

- 3.1. Evaluación del riesgo medioambiental. Evaluación de la exposición. Modelos de cálculo. Supuestos prácticos.
- 3.2. Ensayos de toxicidad. Modelos y cálculos de índices de toxicidad.

Dedicado a la profesora María Jesús Díaz, por sus enseñanzas y los buenos momentos que pasamos juntos en el laboratorio.

1. Normas de Seguridad y Buenas Prácticas en el Laboratorio

Esta guía se ha diseñado para orientar a los alumnos en las Prácticas de Laboratorio, ofreciendo información básica de manejo y protocolos para llevar a cabo las técnicas de una manera segura, rápida y eficaz.

Se debe tener en cuenta que trabajar en un laboratorio conlleva riesgos con consecuencias muy diversas en función de la práctica que se esté realizando. Por lo que se han considerado principalmente los riesgos derivados de las prácticas contenidas en este manual.

Los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) son utilizados para realizar ensayos destinados a obtener los datos sobre las propiedades y peligrosidad para las personas, los animales y el medio ambiente de cualquier sustancia química.

En esta primera parte se explican las características del trabajo de laboratorio, con el fin de evitar riesgos derivados del uso y manejo de los reactivos. Por lo tanto, lo principal es que el alumno debe mantener una atención especial durante el proceso de modo que permanentemente aplique las precauciones específicas para cada práctica.

Normas básicas:

1. Es obligatorio el uso de la bata, manteniéndola en todo momento abrochada. Es recomendable el uso de gafas de seguridad cuando se manipulen productos químicos.
2. No se puede ingerir alimentos o fumar en el laboratorio.
3. Recogerse el pelo y evitar pulseras o colgantes que puedan engancharse.
4. Avisar de posibles alergias.
5. Lavarse las manos al finalizar las prácticas antes de abandonar el laboratorio, incluso si se ha usado guantes.
6. El alumno debe respetar el material y es el responsable de su mantenimiento hasta el final de las prácticas. De modo que al final debe quedar todo perfectamente limpio y recogido tal y como lo encontró.

Normas de trabajo:

1. No pipetear NUNCA con la boca.
2. No trabajar separado de la mesa o poyata.
3. Eliminar adecuadamente los residuos producidos en los bidones habilitados al efecto, no eliminando nunca restos por el desagüe, aunque sean pequeñas cantidades.
4. El uso de aparatos será supervisado siempre por el/los profesor/es encargados de la práctica.

Recordatorio de los pictogramas de etiquetado de productos químicos:



Es importante conocerlos para prevenir lesiones y enfermedades en el laboratorio.

La regulación establecida por la Unión Europea en 2009 sobre clasificación, etiquetado y envasado (CLP) introduce pictogramas con forma de rombo que indican la naturaleza del peligro o peligros asociados a la utilización de sustancias o mezclas peligrosas.

En las etiquetas, los pictogramas van acompañados de palabras de advertencia (atención, peligro), indicaciones de peligro (frases H) y consejos de prudencia (frases P), así como de información sobre el producto y el proveedor.



- I. Los productos químicos con este pictograma significan:
- Gas bajo presión, puede explotar cuando se calienta.
 - Gas refrigerado, puede originar quemaduras o lesiones criogénicas.
 - Gases disueltos.



- II. Este pictograma se refiere a sustancias explosivas, autorreactivas y peróxidos orgánicos que pueden causar una explosión cuando se calientan.

- III. Hay que tener en cuenta lo que significan estos dos pictogramas de aspecto similar:



- 1.- Este advierte acerca de gases, aerosoles, líquidos y sólidos inflamables como:

- Sustancias y mezclas de calentamiento espontáneo.
- Líquidos y sólidos pirofóricos que pueden incendiarse en contacto con el aire.
- Sustancias y mezclas que emiten gases inflamables en contacto con el agua.
- Sustancias autorreactivas o peróxidos orgánicos que pueden provocar un incendio si se calientan.



- 2.- Si encuentras este pictograma en la etiqueta significa que estás en presencia de gases, sólidos o líquidos oxidativos que pueden causar o intensificar un incendio o explosión.

IV. Una sustancia o mezcla que lleve este pictograma puede tener uno o varios de los siguientes efectos:



- Es cancerígena.
- Afecta a la fertilidad y al neonato.
- Causa mutaciones.
- Es un sensibilizante respiratorio, puede provocar alergias, asma o dificultad-respiratoria si es inhalado.
- Resulta tóxica en determinados órganos.
- Peligro por aspiración, que puede ser mortal o muy nocivo si se ingiere o penetra a través de alguna vía.



V. Producto químico extremadamente tóxico en contacto con la piel, si se inhala o ingiere, y que puede resultar mortal.



VI. Siempre que utilices un producto químico con este pictograma no olvides que es corrosivo y que puede provocar quemaduras graves en la piel y daño ocular. También es corrosivo para los metales.



VII. Este pictograma puede referirse a uno o más de los siguientes peligros:

- Toxicidad aguda.
- Causa una sensibilización cutánea, irritación de piel y ojos.
- Irritante para la respiración.
- Es narcótico, provoca somnolencia o mareos.
- Peligroso para la capa de ozono.



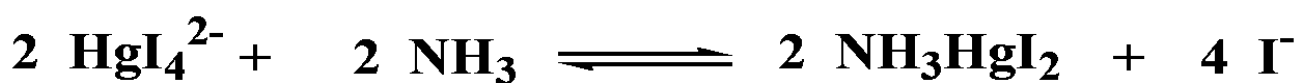
VIII. Este pictograma advierte de que la sustancia es tóxica o nociva para los organismos acuáticos.

2. LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA

2.1. Determinación de Amoníaco en Muestras de Agua por el Método de Nessler.

FUNDAMENTO

El reactivo Nessler, en presencia de iones amoníaco, se descompone formando yoduro de dimercuriamonio que permite la determinación colorimétrica de los iones amonios. El reactivo de Nessler produce una coloración gradual de amarillo a pardo, a medida que aumenta la concentración de amoníaco.



REACTIVOS

1) Preparación del reactivo de Nessler:

- **Solución A:** disolver 160 g de NaOH en 500 mL de H₂O.

- **Solución B:** Disolver 70 g de IK en 100 mL de agua y añadir 100 g de I₂Hg y llevar hasta 500 mL.

El reactivo Nessler se obtiene mezclando a partes iguales la solución **A+B**.

2) Solución de Tartrato de Sodio y Potasio:

Disolver 50 g de Tartrato doble de Sodio y Potasio tetrahidratado en 100 mL de agua, esta solución impide la precipitación de Ca y Mg con el reactivo de Nessler.

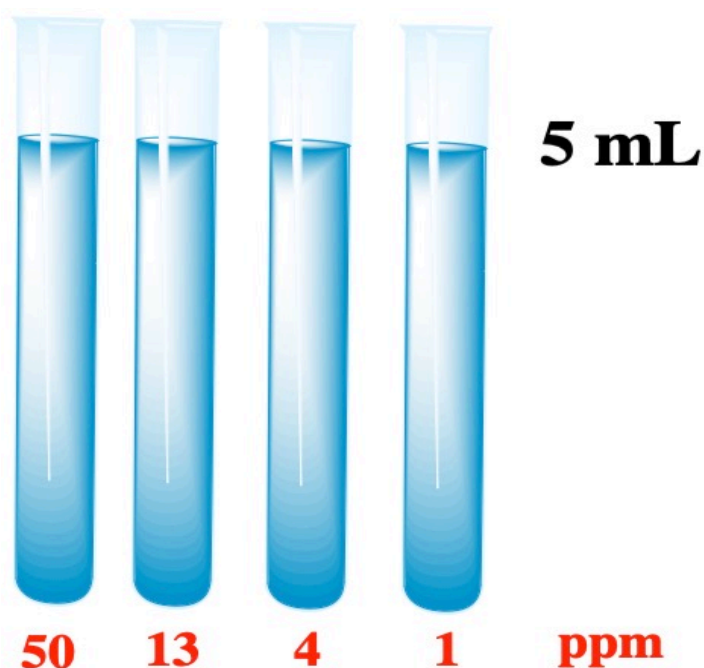
3) Solución Patrón de Cloruro de Amonio:

Pesar 3,819 g de Cloruro de amonio en 1 L de agua destilada; contiene 1290 ppm de NH_4^+ (1300 ppm).

PROCEDIMIENTO

Preparación de la Recta de Calibrado.

A partir de una solución patrón de Amonio de 130 ppm, vamos a preparar las siguientes soluciones; 50, 13, 4 y 1 ppm y las vamos a llevar a un volumen de 5 mL con agua destilada. A continuación, se añaden 0,1 mL de tartrato sódico-potásico y 0,1 mL de reactivo de Nessler en cada tubo de ensayo.

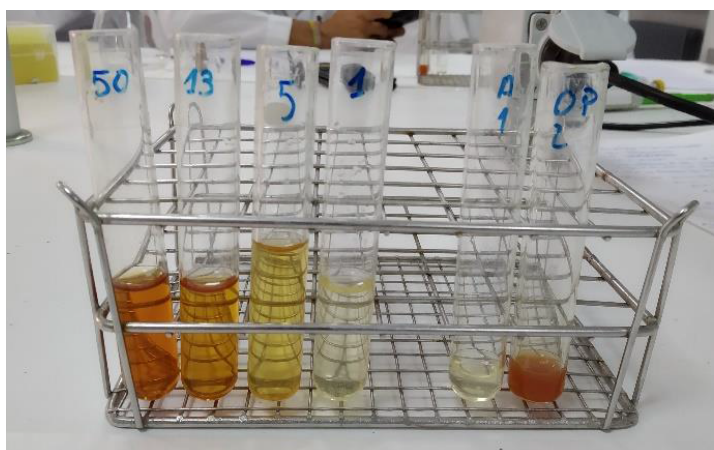


Preparamos 3 muestras en tubos de ensayo;

- Muestra 1: Recoger 1 mL de agua de grifo.
- Muestra 2: 1 mL de agua de pecera.
- Muestra 3: 1 mL de agua destilada.

Vamos a tratar las muestras con 0,1 mL de tartrato sódico-potásico y 0,1 mL de reactivo de Nessler y a determinar los niveles de amonio.

Determinación cualitativa: Si se produce una coloración amarilla indica que el contenido en amoníaco es < 5 ppm, el color pardo rojizo indica un contenido en amoníaco > 10 ppm.



Determinación cuantitativa:

Se toman 100 mL de muestra, se alcaliniza la muestra con NaOH 6N y se elimina la turbidez con SO_4Zn 10%.

Tratamos las muestras con tartrato sódico-potásico y reactivo de Nessler. Esperamos 10 minutos y se observa el color amarillo.

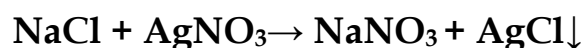
Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 425 nm.

2.2. Determinación De Cloruro Sódico En Pienso Y En Agua De Bebida

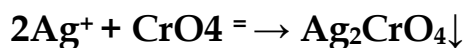
El objetivo de esta práctica es determinar la concentración de sal en muestras de piensos y en una muestra de agua del grifo mediante volumetría de precipitación, siguiendo el Método de Mohr.

FUNDAMENTO

Los cloruros precipitan con AgNO_3 formando un precipitado blanco de AgCl , según la siguiente reacción:



El punto final de la valoración se observa añadiendo una pequeña cantidad de K_2CrO_4 (color amarillo) que formará un precipitado de Ag_2CrO_4 (pardo-naranja), una vez terminada la reacción entre el cloruro y la plata, según la reacción:



REACTIVOS

- Nitrato de Plata (AgNO_3): 0,1 M. PM = 169,87 g/mol
- Dicromato potásico (K_2CrO_4) al 10 %
- Disolución de NaCl patrón: Pesar 1,0 g/1 L (1000 ppm)

Estandarización de la disolución de AgNO_3

Poner en un matraz, 10 mL de la disolución de NaCl (0,1 g/l) añadir 40 mL de agua destilada y 0,5 mL de la disolución de K_2CrO_4 . Añadir el AgNO_3 con una bureta hasta viraje del indicador de amarillo (turbio) a pardo-anaranjado (turbio).

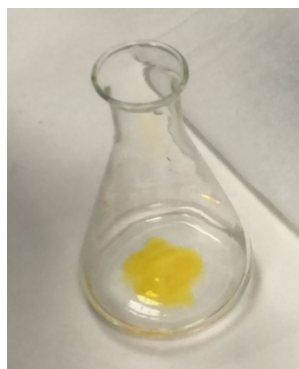
Determinación de Sal en una Muestra de Pienso y en Muestras de Agua del Grifo. (Método de Mohr)

PROCEDIMIENTO

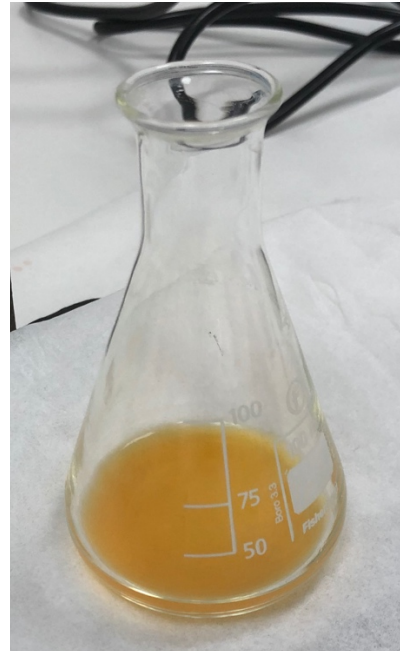
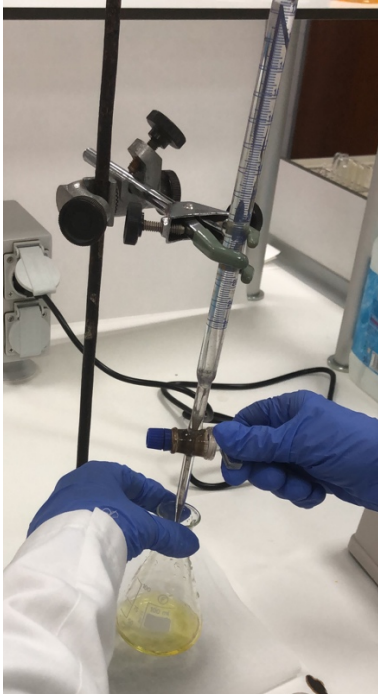
1. Pesar 1 g de la muestra sólida y disolver en 10 mL de agua destilada, agitar durante 5 minutos.
2. Tomar 100 mL de agua del grifo y seguir el mismo procedimiento.
3. Las muestras sólidas se filtrarán con papel de filtro a otro matraz.



4. Añadir a este matraz, que contiene el sobrenadante, 4-5 gotas del indicador (K_2CrO_4).



5. Valorar esta solución añadiendo despacio con una bureta, gotas de AgNO_3 , hasta el viraje del indicador amarillo (turbio) a pardo-anaranjado.
6. Apuntar en el cuaderno los mL de AgNO_3 , gastados para las muestras sólidas y el agua.



CÁLCULOS

$$N = \text{n}^\circ \text{ de equivalentes} / \text{Volumen}$$

$$\text{n}^\circ \text{ de equivalentes} = \text{g} / \text{PM}$$

$$\text{PM NaCl} = 58,4 \text{ g/mol}$$

Después de realizar los cálculos para la muestra sólida y el agua, valora los resultados y comenta tus conclusiones.

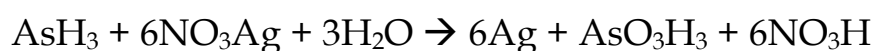
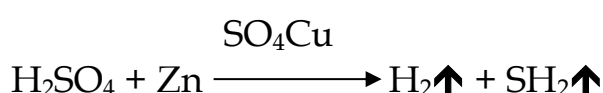
PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. ¿Cómo prepararías la solución de Nitrato de plata 0,1 N y PM= 169,87 g/mol?
2. Los niveles aceptables de sal en los piensos son de 0,5-1%. En función de los resultados obtenidos del porcentaje de sal en el pienso ¿Se puede decir que los niveles de sal están entre los niveles aceptables?
3. Los niveles permitidos de sal en el agua de bebido son < 0,5%. En función de los resultados obtenidos del porcentaje de sal el agua de bebida ¿Se puede decir que los niveles de sal están entre los niveles aceptables?
4. Si se superan los niveles de sal en el pienso y en el agua de bebida, indique que síntomas puede sufrir el animal.

2.3. Determinación De Arsénico por el método de Gutzeit.

FUNDAMENTO

La identificación la llevamos a cabo a través del Método de Gutzeit. La reacción de Gutzeit evidencia la presencia de Arsénico en la muestra que vayamos a analizar, está basada en que el hidrógeno arseniado, desprendido en la reducción de la muestra con hidrógeno nascente, al reaccionar con un papel reactivo de nitrato de plata, lo reduce a plata metálica formando un halo negro.



MATERIAL Y REACTIVOS

- Matraz de Gutzeit
- H_2SO_4
- Sulfato de cobre al 10%
- Zinc metal en forma de perlas
- Nitrato de plata 1N

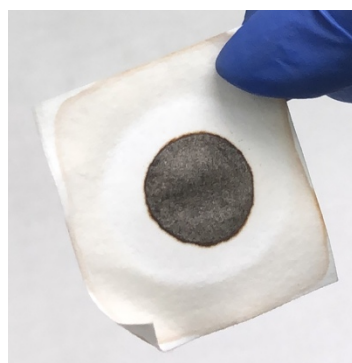
PROCEDIMIENTO

- Se introducen 5 g de la muestra problema en el matraz.
- Añadimos 1 mL de agua destilada para homogeneizar la muestra.
- Posteriormente introducimos dos perlas de zinc que actúa como reductor.
- Y finalmente dos gotitas de sulfato de cobre que actúa como catalizador acelerando la reacción.
- En el extremo superior del matraz se coloca un papel de filtro al que se le adiciona una gota de nitrato de plata.
- A continuación, se adiciona H_2SO_4 al matraz hasta llegar a una concentración aproximada del 10 %.
- Dejar el matraz Gutzeit durante 10 minutos en oscuridad.
- Si en la muestra hay arsénico aparecerá en el papel de filtro una mancha de color negro brillante es que hay presencia de arsénico debido a que el nitrato de plata se reduce a plata metálica.
- En el caso contrario, se mantendrá el papel intacto.

NEGATIVO



POSITIVO



2.4. Determinación de Cianuros.

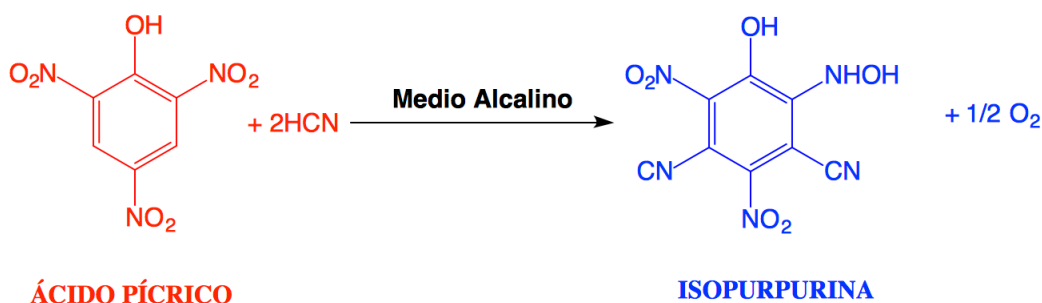
Niveles en plantas de 200 ppm son tóxicos.

Agua de bebida máximo permitido 2 ppm.

A. Determinación de cianuros: Método de Grignard

FUNDAMENTO

Esta reacción está basada en la formación de isopurpurina por fijación del ácido cianhídrico sobre el ácido pícrico en presencia de un álcali. Esta reacción es característica del cianuro. Las muestras deben conservarse en frío para evitar la acción enzimática y bacteriana sin agregado de conservantes ya que es una reacción muy sensible.



MATERIAL Y REACTIVOS

Papel picrosodado:

- En un matraz se ponen 0,5 g de ácido pícrico y 5 g de bicarbonato sódico, los cuales se diluyen hasta 100 mL de agua.
- En esta solución sumergimos tiras de papel de filtro dejándolo después durante 10 minutos en oscuridad.

Procedemos a secarlas en una estufa a 37 °C y las colocaremos en el matraz con la muestra tratada.

PROCEDIMIENTO

1. Se toman dos matraces. En un matraz ponemos la muestra problema (homogeneizado de plantas cianogénicas, yuca, almendra amarga, laurel, mandioca etc.), y en otra muestra control.
2. Añadimos 50 mL de agua unas gotas de cloroformo y unas gotas de ácido sulfúrico.
3. Se suspende la tira de papel picosodado en el matraz sin que toque el líquido y tapamos el matraz.

Si hay cianuros en la muestra observaremos una coloración rojo anaranjada en la tira de papel picosodado; si no existen cianuros, no se observa ningún cambio de color en la tira. La intensidad del color variará en función de los niveles de cianuros de la muestra. Comparar con el control.



B. Determinación de cianuros: Método de azul de prusia

FUNDAMENTO

Su determinación se puede hacer en alimentos, fluidos biológicos y tejidos.

Se basa en la formación de ferrocianuros que después es tratado con una sal férrica, es una reacción muy específica para el cianuro.

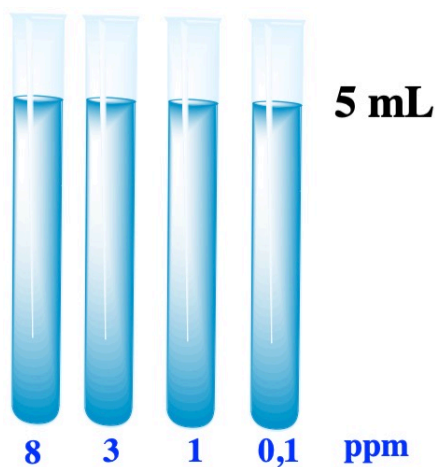
REACTIVOS

- Soluciones de CNK (10 mg/mL)
- Sulfato ferroso 2%
- Cloruro Férrico al 30%
- HCl 0,1 N

PROCEDIMIENTO

Recta de calibrado:

A partir de la solución stock de 10 mg/mL hacer las siguientes diluciones: 8, 3, 1 y 0,1 mg/mL y llevar a un volumen de 5 mL con agua destilada.



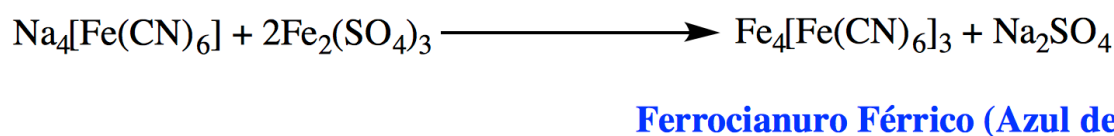
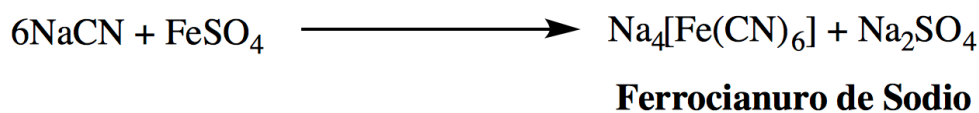
Añadir a todos los tubos 1 mL de sulfato ferroso, agitar y dejar reposar 4 minutos.

Añadir unas gotas HCl, 2-5 gotas de Cl_3Fe , mezclar.

Aparece un color azul de Prusia. Determinar el límite de detección del método.

Preparación de muestras de alimentos:

1. Colocar 10 gr de muestra (mandioca...) en un matraz de destilación
2. Añadir 50 mL agua.
3. Añadir 10 mL de ácido tartárico al 10% y destilar.
4. Recoger el destilado sobre 5 mL de NaOH 10%, medir el volumen destilado.
5. Coger 1mL de la muestra y añadir 1 mL de Sulfato ferroso.
6. Añadir unas gotas de HCl y unas gotas de Cl_3Fe .
7. Comparar el color con la recta de calibrado.
8. Para la determinación cuantitativa leer a $\lambda = 680 \text{ nm}$



PROBLEMAS Y CUESTIONES

Sabiendo que la Dosis de Referencia Aguda (DRA) para los glucósidos cianogénicos es de 0,009 mg/kg pc (expresada como equivalente de CN⁻) y que la Ingesta diaria máxima tolerable provisional (IDMTP) es de 0,02 mg/kg pc, expresada como CN⁻, y teniendo en cuenta que los máximos niveles de HCN permitidos en la yuca dulce son de 50 mg/kg, y en la harina de yuca de 10 mg/kg.

Calcular:

- La cantidad de CN⁻ ingerida por una persona de 60 Kg de peso que come 100 g de yuca dulce y 50 g de harina de yuca.
- Si los niveles ingeridos de CN⁻ superan los de la DRA y IDMTP, describe los síntomas clínicos de la intoxicación.

2.5. Determinación de Ácido Salicílico

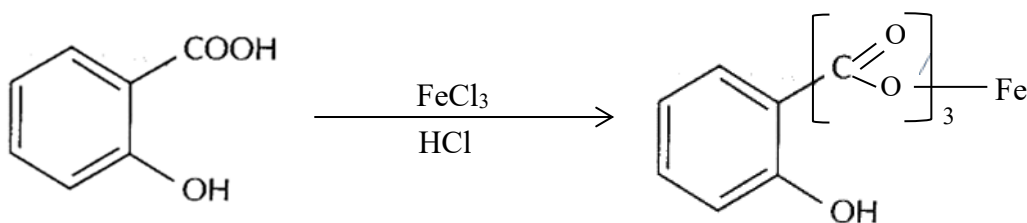
El ácido acetilsalicílico es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), con acción antiinflamatoria, antipirética y analgésica. Además, inhibe la agregación plaquetaria. Actúa inhibiendo de forma irreversible la enzima ciclooxigenasa (COX), lo que provoca una reducción en la síntesis de prostaglandinas, principales mediadores bioquímicos del dolor, fiebre, inflamación y en la formación de trombos.

- **DIAGNÓSTICO DE LA INTOXICACIÓN:**

- De forma cualitativa: Métodos colorimétrico
 - De forma cuantitativa: HPLC
 - Tiempo de protrombina
-
- Niveles Terap. Plasma, orina = 20-100 ppm.
 - Niveles tóxicos en orina 600-900 ppm y en sangre 300 ppm.

FUNDAMENTO (ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA)

Para la determinación de la presencia del ácido acetilsalicílico en muestras de orina se emplea un método cualitativo, que se basa en la formación de un compuesto de color violeta al hacer reaccionar el salicilato con una sal férrica en medio ácido.



REACTIVOS

- Agua Destilada
- Solución stock de salicilato 10 mg/kg
- Solución de Cloruro Férrico
- HCl 0,1 N

PROCEDIMIENTO

Se determinará la concentración de salicilatos en orina partiendo de una recta de calibrado de soluciones de salicilato de concentraciones conocidas. Para obtener la recta de calibrado partiremos de una solución de 10 mg/mL de salicilato y se obtendrán las diluciones de concentración 4, 1, 0,5 y 0,2 mg/mL. El volumen final de cada dilución será de 3 mL.

A continuación, añadiremos a la recta de calibrado unas gotas de HCl 0,1 N y unas gotas de Cl_3Fe . El mismo procedimiento seguiremos para las muestras de orina del animal intoxicado y del control. En todas las muestras que contengan salicilato aparecerá una coloración violeta. Seguidamente, se determinará la concentración de salicilato en la muestra de orina del animal intoxicado a partir de la recta de calibrado.



3 mL

4 1 0,5 0,2 mg/mL

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. SUPUESTO PRÁCTICO: En la explotación ganadera “La Corza”, el ganadero administró el Fármaco Febrinol a una piara de cerdos de aproximadamente 100 Kg de peso, en el agua de bebida a la concentración de 30 gr de Febrinol por cada 10 L de agua. Se sabe que los cerdos de 100Kg consumen aproximadamente 9 L de agua al día.
 - 1.1. Calcular la dosis administrada de ácido acetilsalicílico en el agua de bebida para la concentración de Vetalgine de 30g por cada 10 L de agua.
 - 1.2. En función de la dosis administrada ¿Ha habido sobredosificación?
 - 1.3. En caso de que haya habido sobredosificación. ¿Qué síntomas presentarán los cerdos?
 - 1.4. En caso de sobredosificación. ¿Qué concentración de Febrinol tendría que haber administrado el ganadero para que no hubiera existido la misma?

2. Indique como se realizan los cálculos para las diferentes diluciones para obtener la recta de calibrado

3. Calcular el límite de detección del método.

4. Indicar los niveles aproximados de salicilatos en la muestra de orina comparándolos con los colores de la recta de calibrado

2.6. *Determinación de Nitratos y Nitritos.*

La intoxicación por nitratos y/o nitritos se presenta con relativa frecuencia en las explotaciones ganaderas como consecuencia de accidentes, errores, contaminaciones o problemas relacionados con la alimentación de los animales. De 100 a 250 gramos de nitrato potásico por animal, o 560-750 mg/kg de nitrato sódico, producen la muerte en équidos y bóvidos, y 30 g de nitrato potásico son letales para ovejas y cerdos.

En cuanto a los nitritos, la toxicidad se encuentra entre 50 y 70 mg/kg para la mayoría de las especies. Así, forrajes con más de un 1,5% de nitrato potásico, o aguas o piensos con más de 3.000 ppm de nitratos, son capaces de producir intoxicaciones en los animales.

Cuando los rumiantes consumen nitrato con el alimento o en el agua de bebida, la fermentación de los carbohidratos proporciona el poder reductor necesario para su conversión a nitrito y de éste a amoníaco. Como la conversión del nitrato a nitrito es más rápida que del nitrito a amoníaco, un déficit de poder reductor, provocará una acumulación en el líquido ruminal de nitrito que pasará a la sangre.

El nitrito es un compuesto metahemoglobinizante, es decir, cambia la hemoglobina (el transportador de oxígeno desde los pulmones a los tejidos) a metahemoglobina la cual no tiene capacidad de transportar oxígeno eficientemente. Además, debido a su efecto vasodilatador periférico, provoca un descenso de la presión sanguínea y shock circulatorio. Ambas circunstancias ocasionarán hipoxia tisular tanto más grave cuanto mayor sea la concentración de nitrito en la sangre. La tasa de conversión de hemoglobina a metahemoglobina depende de la concentración de nitrito en la sangre. A 50 mg/L la proporción de metahemoglobina es un 24%, cuando la concentración de nitrito alcanza 250 mg/L, la proporción de metahemoglobina es próxima al 100%. Si el nivel de metahemoglobina supera el 80% de la hemoglobina total, el animal muere por hipoxia.

A. ANÁLISIS CUALITATIVO DE NITRATOS EN PIENSO

REACTIVOS

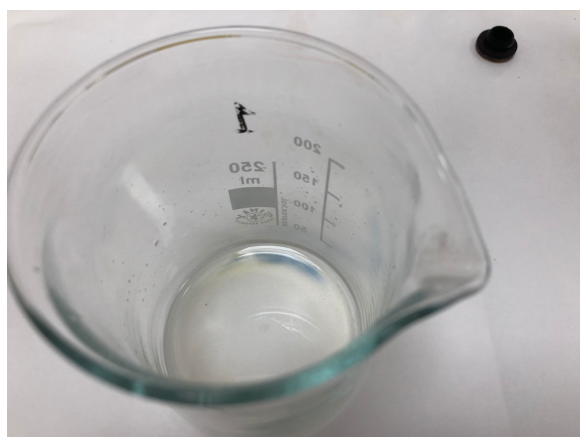
- **Difenilamina:**
 - Pesar 0,25 g/ 10 mL de agua y añadir 40 mL de H_2SO_4 cc
- **Acido sulfúrico al 80%.**
 - Coger y poner en un frasco 20 mL de agua y añadir 80 mL de H_2SO_4 cc.
- Mezclar a partes iguales 50 mL de Difenilamina + 50 mL de H_2SO_4 cc. (80%)

FUNDAMENTO

Analizamos cualitativamente la presencia de Nitratos en el agua de bebida, plantas y pienso.

En el caso de pienso, a 2 gr de pienso se le añade agua destilada, se filtra y en el filtrado se añaden gotas del reactivo. En caso positivo (niveles de nitratos entre 0,5-1%) aparecerán unas manchas azules.

La comprobación del material sospechoso se realiza dejando caer una gota de reactivo sobre la superficie de corte de una planta. Un cambio de color de verde a azul significaría una reacción positiva, indicando un contenido de nitrato superior al 2%.



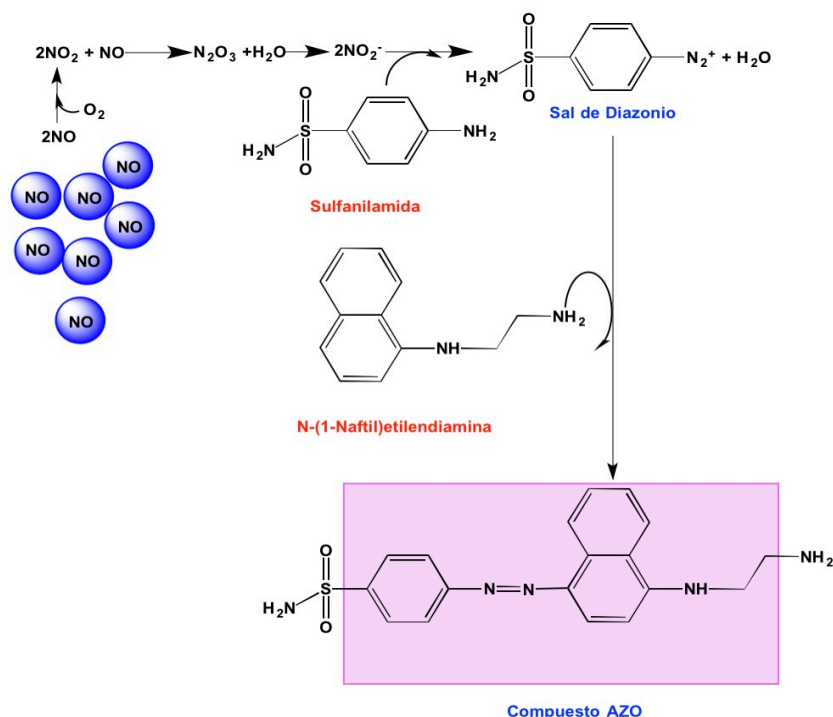
B. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE NITRITOS EN ALIMENTOS Y AGUA DE BEBIDA

Según el Código Alimentario Español, los productos cárnicos pueden tener un contenido en nitrito sódico no superior a 150 ppm. El empleo de nitrito/ nitrato en la elaboración de derivados cárnicos es esencial para conseguir su color típico y para garantizar la ausencia de *Clostridium botulinum*.

FUNDAMENTO

La medida de nitritos se realiza mediante su transformación en un compuesto AZO de color rosa. Tras la extracción de los nitritos presentes en la muestra con agua alcalina caliente, la transformación ocurrirá en dos pasos:

- 1) En medio ácido se produce la reacción entre una amina primaria, la sulfanilamida, con los nitritos presentes en la muestra. El resultado final de esta reacción es la formación de una sal de diazonio.
- 2) A la sal de diazonio resultante se le acopla una amina aromática, *N*-(1-naftil)-etilendiamina, para dar lugar al compuesto AZO de color rosa.
- 3) Por último, se lee la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Visible a una longitud de onda de 540 nm y se cuantifica la respuesta. Para ello se elabora una recta patrón partiendo de una solución que contiene 0,25 por mil de nitrito sódico.



REACTIVOS

- **Agua alcalina caliente:** alcalinizar 1 L de agua destilada a pH = 8-9, con NaOH 0,1 N (1% de NaOH es suficiente). Calentar hasta ebullición antes de su empleo.
- **Reactivos Carrez:** Ferrocianuro al 15 % y Acetato de zinc al 30 %
- **Sulfanilamida al 1 %:** disolver 1 gr de sulfanilamida en 100 mL de una solución de HCl 1,5 N. Guardar en frasco topacio.
- **N-(1-Naftil) etilendiamina al 0,1%:** 0,1gr /100 mL de H₂O.
- **Ácido Clorhídrico 1,5 N:** PM = 36,47; Riqueza= 35 % y D= 1,18 Kg/L

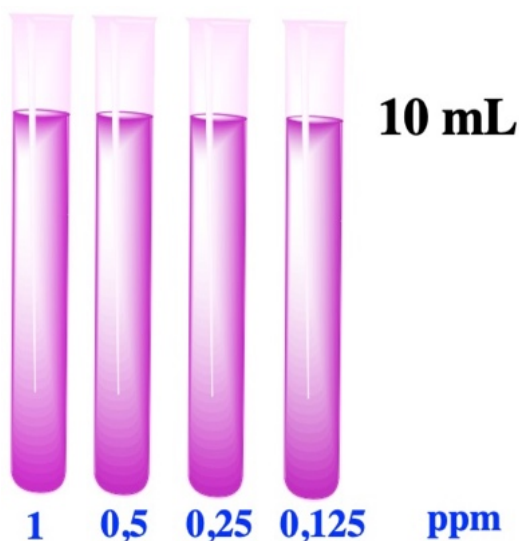
CONSTRUCCIÓN DE LA RECTA PATRÓN DE NITRITO SÓDICO

Solución patrón de nitrito sódico: 0,25 mg/mL.

A partir de esta solución preparar las siguientes concentraciones y llevar a un volumen de 10 mL con agua destilada: 10, 5, 2,5 y 1,25 µg/mL.

Si estas soluciones son muy concentradas hacer una posterior dilución (1:9) para llegar a las siguientes concentraciones: 1; 0,5; 0,25 y 0,125 µg/mL. Una vez hechas las diluciones añadir a cada tubo:

- 1 mL de la solución de sulfanilamida, agitar los tubos.
- 1 mL de N-(1 naftil)-etilendiamina agitar. Dejar los tubos en reposo 5 min hasta la aparición de un color rosado, Leer a 540 nm en un espectrofotómetro (UV/Visible) frente a un blanco.



PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS

Partimos de 2 g de muestra problema y la disolvemos en 25 mL de agua, pH = 8-9 caliente en un matraz.

- Calentamos el matraz a ebullición, y dejamos enfriar.
- En el matraz echamos 1 mL de ferrocianuro potásico al 15% y 1 mL de acetato de Zn al 30% (se utilizan como agentes clarificantes).
- Filtramos el contenido del matraz con papel de filtro.
- Del filtrado cogemos 1 mL y añadimos 1 mL de sulfanilamida y 1 mL de N-(1-naftiletildiamina), agitamos y leemos a $\lambda = 540$ nm.

DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN EL AGUA DE GRIFO

Se coge 1 o 2 mL del agua de grifo y se le añade 1 mL de sulfanilamida y 1 mL de N-(1-naftil-etilendiamina) y leemos a $\lambda = 540$ nm.

CÁLCULOS:

$$\text{NaNO}_2 \text{ (ppm)} = \frac{(C \times V)}{M}$$

C = concentración de nitrito sódico (NaNO_2) en la recta de calibrado.

M = gr de muestra tomada.

V = mL del sobrenadante.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

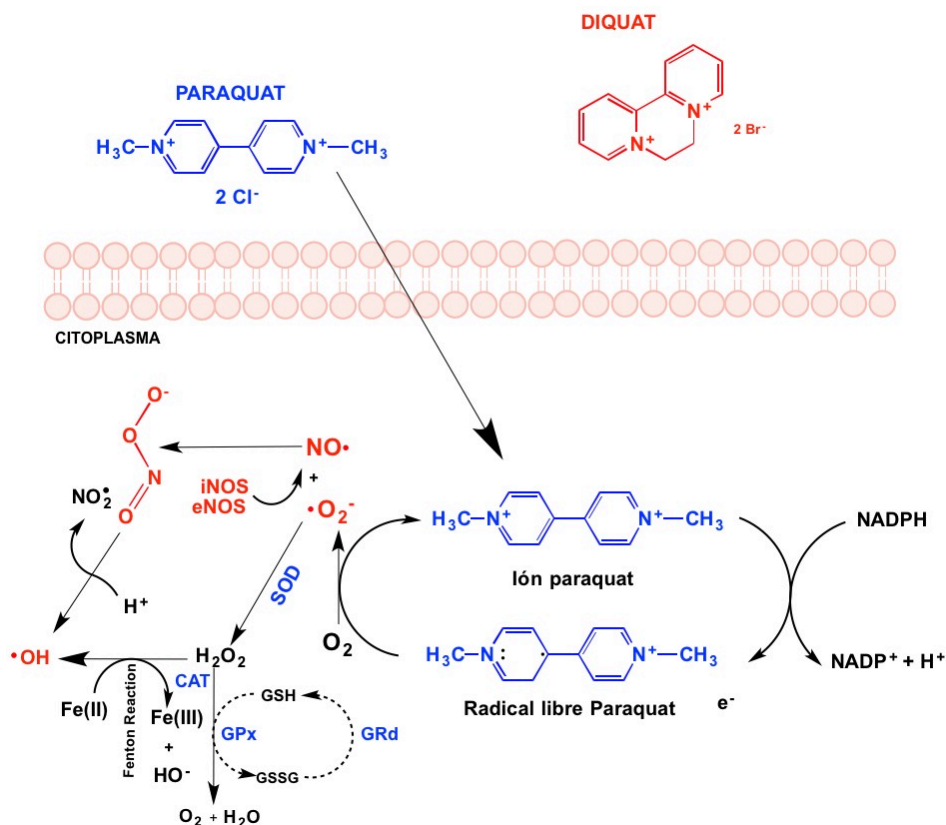
1) Explicar cómo se hacen las diferentes diluciones a partir de la solución estándar de nitrito sódico de (0,25 mg/mL) para obtener 10, 5, 2,5 y 1,25 $\mu\text{g/mL}$, llevar a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Construir la recta de calibrado. Calcular los niveles de Nitritos en las muestras analizadas. Indicar si los niveles de nitritos encontrados en el agua de bebida y en el alimento están dentro de los niveles permitidos. Comenta los resultados.

2.7. Determinación Colorimétrica de Paraquat y Diquat en Muestras de Orina.

El paraquat y el diquat son herbicidas bipyridilos no selectivos para el control de malas hierbas.

En su forma líquida, el paraquat, se utiliza como herbicida de contacto para destruir las partes verdes de las plantas en presencia de la luz solar. El uso más frecuente del diquat es como herbicida acuático.

Los pulmones son el primer blanco del paraquat, y los efectos pulmonares representan la manifestación más letal y menos tratable de la toxicidad. El mecanismo principal es la generación de radicales libres que oxidan el tejido pulmonar. El diquat absorbido sistémicamente no se concentra de manera selectiva en el tejido pulmonar, como lo hace el paraquat, por lo cual la lesión pulmonar causada por el diquat es menos grave.



En estudios con animales, el diquat causa lesiones ligeras y reversibles a los neumocitos tipo I, pero no lesiona las células tipo II. No se ha advertido fibrosis pulmonar progresiva en el envenenamiento con diquat. Sin embargo, el diquat tiene efectos tóxicos severos en el sistema nervioso central que no son típicos del envenenamiento por paraquat.

Confirmación de Envenenamiento: Paraquat y Diquat

Podemos usar una prueba colorimétrica para identificar el paraquat y el diquat en la orina y dar una indicación aproximada de la magnitud de la dosis absorbida.

PROCEDIMIENTO

A un volumen de orina (1 mL) se añaden 200 µl de una solución recién preparada de ditionito sódico al 1% en una solución normal de NaOH 1N. Esperamos 1 minuto y observamos la aparición de color.

RESULTADOS

El **color azul** indica la presencia de paraquat en exceso de 0,5 mg/L. La prueba de ditionito tiene un valor pronóstico aproximado cuando se realiza la prueba con orina recolectada en las primeras 24 horas después de ingerir paraquat.

Concentraciones menores a 1 mg/L nos daría un color azul claro indicativo de supervivencia, mientras que las concentraciones superiores a 1 mg/L (azul marino a azul oscuro) con frecuencia, vaticinan un resultado fatal.

En esta misma prueba, el diquat en la orina produce un **color verde**.

El paraquat y el diquat pueden medirse en sangre y orina por métodos espectrofotométricos, de cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y radioinmunoensayo.



2.8. *Determinación de Barbitúricos en Muestras de Plasma Sanguíneo por Espectrofotometría.*

Los barbitúricos se usan como anestésicos no volátiles, hipnóticos y sedantes. Las intoxicaciones en animales debido a su uso como anestésicos es más probable que se produzca con los barbitúricos de acción corta y ultracorta (tiopental y pentobarbital) que con los de acción larga (fenobarbital). A dosis bajas (sedantes o anticonvulsivantes), los barbitúricos no tienen efecto significativo sobre el sistema cardiovascular. A dosis mayores (hipnóticos) pueden provocar una ligera hipotensión y bradicardia. A dosis aún superiores producen una manifiesta depresión del sistema cardiovascular.

Los barbitúricos son depresores del sistema nervioso central y además pueden también deprimir la actividad noradrenérgica. Los barbitúricos incrementan la afinidad del GABA (neurotransmisor inhibitorio) por sus receptores situados en el sistema nervioso central y promueve la apertura de los canales de cloro ligados a estos receptores. Esto determina una entrada masiva de iones Cl⁻ a nivel de la membrana postsináptica lo que conduce a una hiperpolarización de la misma y como consecuencia se favorece la relajación.

PRINCIPALES USOS DE LOS BARBITÚRICOS EN MEDICINA VETERINARIA:

- 1) Como anestésicos, tiopental (8-12 mg/Kg vía i.v.) y pentobarbital sódico, a dosis de 25 a 35 mg/Kg por vía i.v en solución acuosa en perros
- 2) Como anticonvulsivantes, fenobarbital por vía oral. Administrar 5,5 mg/Kg vía oral una vez al día los niveles terapéuticos alcanzados están entre 12-40 µg/mL
- 3) Como agentes eutanásicos, el más común es el pentobarbital sódico a dosis de 50 a 60 mg/Kg vía i.v.

Químicamente corresponden a ácidos débiles, poco solubles en agua y muy solubles en alcohol y solventes orgánicos. Los derivados sódicos son muy solubles en agua, insolubles en solventes orgánicos y frecuentemente producen soluciones altamente alcalinas.

IDENTIFICACIÓN DE BARBITÚRICOS.

Para la identificación de barbitúricos, en el caso hipotético de que no sepamos con que barbitúrico ha sido tratado el animal, algo que no suele ocurrir en las clínicas veterinarias, sería conveniente realizar un barrido en un espectrofotómetro UV/Visible.

Al realizar un barrido veríamos el espectro propio correspondiente al barbitúrico que habría en la muestra a analizar y lo mas importantes sabríamos a que longitud de onda (240 nm) presenta el máximo de absorción.

JUSTIFICACIÓN DE LA PRÁCTICA.

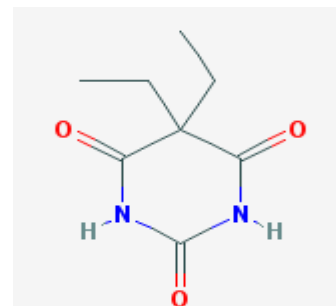
Una vez identificado el barbitúrico analizaríamos el barbitúrico en sangre (plasma) para determinar si los niveles son niveles terapéuticos o niveles tóxicos, algo muy importante a la hora de establecer una pauta de dosificación

Por ejemplo, el Fenobarbital es el anticonvulsivante de elección para el tratamiento de las convulsiones y para la prevención de ataques debidos a epilepsia en perros. Las dosis recomendadas por la AEMPS para los diferentes medicamentos veterinarios cuyo principio activo es el fenobarbital (Phenoleptil, Soliphen etc) es de 2,5 mg/Kg dos veces al día por vía oral y se deben medir los niveles plasmáticos después de haber alcanzado el estado de equilibrio estacionario. El intervalo terapéutico ideal para la concentración de fenobarbital en plasma está entre 15- 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Si la concentración sérica es menor de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o los ataques no están controlados y se puede aumentar la dosis en un 20% cada vez, pero siempre vigilando los niveles plasmáticos. Por lo tanto, nuestro objetivo es que el alumno sepa aplicar una técnica analítica para poder aplicar en el laboratorio o en la clínica que le será de gran utilidad a la hora de verificar los niveles plasmáticos de un barbitúrico en plasma y poder establecer una posología adecuada.

MÉTODO DE ANÁLISIS

REACTIVOS:

- Fenobarbital o Fenobarbital sódico
- Solución de Amonio al 30% (preparamos una dilución 1+27)
- Cloroformo o dicloroetano
- Ácido clorhídrico (HCl)



Construcción de la Recta de Calibrado del Barbitúrico (Pentobarbital o Fenobarbital).

- Solución Standard 0,6 mg/mL a partir de esta solución hacemos las siguientes diluciones siempre con NH₄OH (1+17), ya que los barbitúricos para poder cuantificarlos por espectrofotometría UV/Visible tienen que estar ionizados.
- Diluciones : 3 ppm; 6 ppm; 8 ppm; 12ppm Una vez hechas las diluciones leemos en el espectrofotómetro UV/visible a una $\lambda = 240$ nm.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN BARBITÚRICOS A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA

- Tomamos 1 mL de plasma a la que hemos añadido el barbitúrico, y ponemos unas gotas de Acido clorhídrico , para poner el plasma en medio acido (generalmente los compuestos ácidos se extraen en un medio acuoso acido (esto hace que los barbitúricos en medio acido no se encuentren ionizados y es más fácil extraerlos de los medios acuosos con solventes orgánicos)
- Después se adicionan al tubo 5 mL del solvente orgánico (Cloroformo).
- Se centrifugan los tubos 10 min a 3000 rpm.

- Tras la centrifugación, la fase orgánica se separa con pipeta pasteur y se lleva a un matraz redondo (esta operación la podemos realizar tres veces), llevamos las fases orgánicas al matraz y evaporamos a sequedad en un rota vapor.
- Tras la evaporación de los solventes orgánicos hacemos soluble el residuo correspondiente al barbitúrico en NH_4OH (1+27) y leemos en el UV/Visible a una longitud de onda de 240 nm.
- Extrapolamos la absorbancia de nuestra muestra problema en la recta de calibrado previamente calculada y obtenemos la concentración (en ppm) del barbitúrico en las muestras analizadas.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1) Explicar cómo se realizan las diferentes diluciones para hacer la recta de calibrado. Hacer la recta de calibrado y cuantificar los niveles del barbitúrico ensayado. Interpretación de los resultados

2) Buscar en la Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) la Ficha Técnica de un Barbitúrico (Fenobarbital o Pentobarbital) y hacer un resumen

2.9. *Determinación de Fenotiazinas en Muestras de Orina por Colorimetría.*

Los derivados fenotiacínicos se utilizan como tranquilizantes, son antipsicóticos poco potentes, poseen actividad antiemética, hipotensora e hipotérmica.

Las fenotiazinas tienen una alta eficacia terapéutica y son compuestos seguros. Pero presentan ciertos efectos tóxicos que afectan al SNC y al sistema cardiovascular.

1.- ANÁLISIS CUALITATIVO: REACTIVO FPN

Para la detección e identificación cualitativa de los derivados Fenotiacínicos en muestras de orina y leche se utiliza el reactivo FPN (Cloruro férrico, Acido perclórico y Acido Nítrico).

Para su preparación se utiliza:

- 5 mL de Cl_3Fe al 5%;
- 45 mL de Acido perclórico al 20% ;
- 50 mL de acido nítrico al 50%.

PROCEDIMIENTO

Se añaden a las muestras de orina o leche 1 mL de FPN.

- Si en mi muestra hay acepromacina el color de la orina o leche será naranja
- Si en mi muestra hay clorpromazina el color de la orina o leche será rosa
- Si en mi muestra hay levopromazina el color de la orina o leche será violeta
- Si en mi muestra hay tioridazina el color de la orina o leche será azul-verdoso

2.- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE FENOTIAZINAS EN ORINA

Reactivos:

- Dicloroetano
- Solución de quinhidrona $10^{-3}M$ en diclorometano (PM=218).
Pesar 1,09 mg de quinhidrona y disolver en 5 mL de diclorometano (0,2182 gr/L)
- Solución acuosa de hidróxido sódico, 40 g/100 mL
- Acido ortofosfórico al 85% (d=1,71)

A. Recta de calibrado.

Para realizar la recta de calibrado partimos de una concentración de (0,1 mg/ mL) de CLORPROMAZINA:

Completa los volúmenes de la solución STOCK de Clorpromacina (0,1 mg/mL) que hay que utilizar para cada punto de la recta patrón, si queremos un volumen final de 10 mL.

	Blanco 0 $\mu\text{g/mL}$	Tubo 1 25 $\mu\text{g/mL}$	Tubo 2 50 $\mu\text{g/mL}$	Tubo 3 100 $\mu\text{g/mL}$	Tubo 4 150 $\mu\text{g/mL}$
Sol. Clorpromacina (0,1 mg/mL)	0				
Dicloroetano	5 mL	4,75 mL	4,50 mL	4 mL	3,5 mL
Quinhidrona	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Ac. ortofosfórico	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL

Agitar los tubos y esperar hasta que la coloración sea homogénea y estable. Retirar la fase superior y leer la absorbancia de la fase inferior.

- Clorpromazina : $\lambda = 527$

Si nuestra recta la hacemos con otra fenotiazina, la longitud de onda habrá que fijarla:

- Levomepromazina : $\lambda = 565$
- Tioridazina : $\lambda = 637$

B. Extracción de muestras de orina. Procedimiento

Primero se extraen las fenotiazinas con dicloroetano en medio alcalino. A continuación, al dicloroetano (fase orgánica) se le añade el ácido ortofosfórico. Las fenotiazinas reaccionan con el ácido, presentando una coloración que gracias a la quinhidrona permanece estable durante horas.

En un tubo colocar:

- 2 mL de orina
- 0,1 mL de NaOH 1N
- 5 mL de dicloroetano

Se agitan los tubos durante 2 minutos. La fase acuosa (arriba) se descarta. En la fase orgánica inferior se añaden:

- 0,5 mL de quinhidrona
- 4 mL de ácido ortofosfórico al 85%

Agitar los tubos y esperar hasta que la coloración se estabilice y eliminar la parte superior y leer la absorbancia de la parte inferior (color rosa) a 527 nm.

Si hubiéramos analizado la tioridazina el color sería azul-verdoso, levomeprazina color malva; y acepromazina color naranja.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

- 1) Construir la Recta de Calibrado de la Clorpromazina.
- 2) Determinar los niveles de Clorpromazina en una muestras de orina. Partiendo de los 3 mL de orina. Indicar los valores en ppm.
- 3) Si encuentro niveles de Clorpromazina en orina ¿Cuál será la interpretación?

2.10. Determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en muestras de sangre total.

La actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en sangre, es un biomarcador utilizado en las intoxicaciones por insecticidas organofosforados y carbamatos. Bajo la denominación de insecticidas organofosforados se incluyen más de 200 sustancias químicas que se emplean como herbicidas, fungicidas, plastificantes y fluidos hidráulicos (en la industria) y como armas químicas.

Los organofosforados son ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y alcohol) y una variedad de alcoholes, generalmente liposolubles.

En la intoxicación por insecticidas organofosforados el principal mecanismo de acción de los compuestos organofosforados es la inhibición de la AChE, responsable de la hidrólisis de la acetilcolina, mediador químico en el impulso nervioso a nivel de la placa neuromuscular que al no ser hidrolizado a colina y ácido acético prolonga su efecto alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso.

DETERMINACIÓN DE LA COLINESTERASA

La determinación de la actividad de la AChE en sangre es la prueba de laboratorio que se utiliza como ayuda diagnóstica en la intoxicación por plaguicidas organofosforados y carbamatos.

La mayoría de los métodos usados normalmente para medir la actividad de la AChE se basan en la hidrólisis de la acetilcolina o de un éster sintético apropiado. Se presupone que la tasa de hidrólisis es proporcional a la cantidad de enzima presente y que el sustrato es hidrolizado por una colinesterasa.

La mayoría de los métodos se basan en el cambio que experimenta el pH cuando es hidrolizada la acetilcolina o un sustrato similar.

A. MÉTODO DE MICHEL

El método de Michel, registra los cambios de pH que se produce en la muestra tras un periodo fijo de incubación utilizando concentraciones y volúmenes normalizados. Los resultados con el método de Michel se presentan como cambio (Δ) en el pH.

REACTIVOS:

- 1) Solución de Saponina al 10%
- 2) Solución Stock de Buffer (4,124 g de barbital sódico; 0,545 g de fosfato potásico y 44,730 g de cloruro sódico en 200 mL de agua destilada)
- 3) Solución Buffer para sangre completa o plasma. Diluir 6,4 mL de la solución stock de buffer con 75 mL de agua destilada, y ajustar a pH= 8 con HCl 0,1 N, y llevarlo a un volumen de 100 mL.
- 4) Solución del sustrato para sangre completa o plasma. Disolver 21,67 mg de acetilcolina perclorato en 1 mL de agua destilada.

MÉTODO

- Coger 80 μ L de sangre control y 80 μ L y de sangre contaminada y añadir 4mL de la solución de saponina y agitar.
- Añadir a cada tubo 4mL de la solución de Buffer pH= 8 y agitar
- Colocar los tubos durante 10 minutos a 25°C
- Pasados los 10 minutos medir y anotar los pH, de la muestra control y muestra problema.
- Añadir a los tubos 0,2 mL de sustrato de acetilcolina, agitar e incubar los tubos durante 1 h a 25°C. Volver a medir el pH.

Calcular por diferencias de pH, los valores de la AchE en unidades MICHEL.

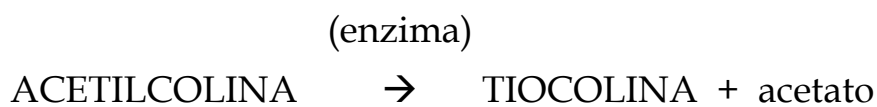
$$\Delta\text{pH}/\text{h, muestra control} = \text{pH}_{1(\text{control})} - \text{pH}_{2(\text{control})}$$

$$\Delta\text{pH}/\text{h muestra problema} = \text{pH}_{1(\text{tratado})} - \text{pH}_{2(\text{tratado})}$$

B. MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA ACETILCOLINESTERASA. METODO DE ELLMAN.

La determinación de la actividad colinesterásica en sangre es la prueba de laboratorio que se utiliza como ayuda diagnóstica en la intoxicación por plaguicidas organofosforados y carbamatos.

ELLMAN, describe un método fotométrico para determinar la actividad de la acetilcolinesterasa en extractos de tejidos, células en suspensión, sangre completa, eritrocitos etc. La actividad enzimática se mide siguiendo el incremento del color amarillo producido cuando la tiocolina formada en la reacción reacciona con el ion ditiobisnitrobenzoato (DTNB), según la siguiente reacción:



La última reacción es rápida y el ensayo es muy sensible (se puede realizar con sólo 10 µl de sangre y en diferentes tejidos). La formación del ion 5-thio-2-nitro-acido benzoico de color amarillo, se mide a 412 nm

REACTIVOS

1) BUFFER FOSFATO 0,1 M pH = 8.

- Na₂HPO₄, PM= 141,96 Solución A (pesar 2,84 g/ 200 mL de H₂O, pH = 9,1)

- KH₂PO₄, PM = 136,09 Solución B (pesar 2,72 g/200 mL de H₂O, pH = 4)

- BUFFER pH = 7, añadir a la solución a 10 mL de la solución B (KH₂PO₄) 50 mL de la solución A (Na₂HPO₄) para obtener un pH =7

- BUFFER pH = 8, añadir a 200 mL de la solución A, 20 mL de la solución B.

2) DTNB 0,01 M. Pesar 39,6 mg /10 mL de buffer fosfato pH = 7 (0,1M) y añadir 15 mg de bicarbonato sódico (no es necesario). Este reactivo es más estable en buffer a pH = 7 que a pH= 8

3) SUSTRATO: Ioduro de acetilcolina, 0,075M, pesar 21,67 mg/ 1 mL de agua destilada.

4) SUSTRATO PARA EL PLASMA: Butirilcolina 24 mM (7,61 mg/ 1 mL de agua)

MÉTODO PARA LA SANGRE COMPLETA

- Se realiza una suspensión de células sanguíneas (sangre completa) en buffer fosfato (pH =8, 0,1 M). Se realiza una dilución 1: 600 (10 µl de sangre en 6000 µl de buffer)
- Se cogen 3 mL de esta suspensión y se añaden en un tubo.
- Añadimos 25 µl de DTNB. Agitamos y dejamos 5 minutos.
- Lo colocamos en las cubetas del UV/Visible, hacemos el cero de absorbancia a 412 nm.
- Sacamos la cubeta de delante y añadimos 20 µl de sustrato, y registramos los cambios de absorbancias durante 3 minutos.

DETERMINACIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA EN OTROS TEJIDOS. (PULMÓN, HÍGADO, ESTÓMAGO, CORAZÓN, CEREBRO)

- Homogeneizamos 20 mg de tejido en 1 mL de Buffer pH = 8; 0,1 M
- Cogemos 0,4 mL de este homogeneizado, y lo añadimos a la cubeta que contiene 2,6 mL de buffer fosfato (pH = 8; 0,1M)
- Añadimos 100 µl de DTNB agitamos, dejamos 5 minutos y hacemos el cero de absorbancia.
- Añadimos 20 µl de sustrato, y registramos el cambio de absorbancia durante 3 minutos.

Cálculos: Actividad (moles /L. por minuto) = $\frac{\Delta \text{Absorbancia}}{\text{min}}$
1.36 x 10⁴

PROBLEMAS Y CUESTIONES

- 1.- Organofosforados usados como ectoparasiticida en animales. Buscar una ficha técnica y hacer un resumen.
- 2.- Calcular el porcentaje de inhibición de la AchE en la muestra de sangre de un animal intoxicado por organofosforados. En función del resultado obtenido hacer los comentarios oportunos.

3. SEMINARIOS DE TOXICOLOGÍA

3.1. Evaluación del riesgo medioambiental. Evaluación de la exposición. Modelos de cálculo. Supuestos prácticos.

INTRODUCCIÓN

Medioambiente: lo conforman todos los elementos naturales y artificiales que están interrelacionados forma natural manteniendo un equilibrio ecológico. La actividad general del hombre puede desencadenar la ruptura paulatina de tal equilibrio lo que conduce a un deterioro del medio ambiente, y por tanto a una degradación en las condiciones de vida de los seres vivos.

Ecotoxicología: es la científica que estudia el efecto de las sustancias y compuestos químicos tóxicos sobre los ecosistemas.

Contaminación: Alterar nocivamente la pureza o las condiciones normales de una cosa o un medio por agentes químicos o físicos. Un contaminante puede ser no solo una sustancia que no está de forma natural en el medio, sino también sustancias naturales que no se encuentran en las proporciones normales, produciendo efectos de toxicidad.

Los contaminantes se pueden clasificar de 3 formas:

- *Contaminantes según su fuente de procedencia.*
 1. Agricultura y ganadería
 2. Generadores de electricidad
 3. Transporte
 4. Minería
 5. Metalurgia
 6. Industria química y electrónica
 7. Tratamiento de residuos
- *Contaminantes según el medio receptor.*
 1. Contaminantes atmosféricos
 2. Contaminantes urbanos
 3. Contaminantes en interiores

4. Contaminantes del agua
 5. Contaminantes marinos
 6. Contaminantes del suelo
- *Contaminantes según los impactos ambientales que ocasionan.*
1. Contaminantes de efecto invernadero
 2. Contaminantes de acidificación
 3. Contaminantes que producen destrucción del ozono estratosférico
 4. Contaminantes que originan eutrofización
 5. Contaminantes que producen toxicidad
 6. Contaminantes que inducen la formación de smog
 7. Contaminantes que producen ecotoxicidad

DISPERSIÓN DE LOS CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

Una vez emitidos los contaminantes pueden ser transformados o degradados a otros compuestos menos tóxicos por la acción de las reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar en el medioambiente, pero estas reacciones pueden llegar a saturarse, superándose las capacidades de dichas reacciones para transformar los contaminantes acumulándose por encima de las concentraciones seguras y dando lugar a los fenómenos de toxicidad. Para evitarlo es importante que se produzca la dispersión de los contaminantes por medio de los distintos factores meteorológicos (Figura 1).

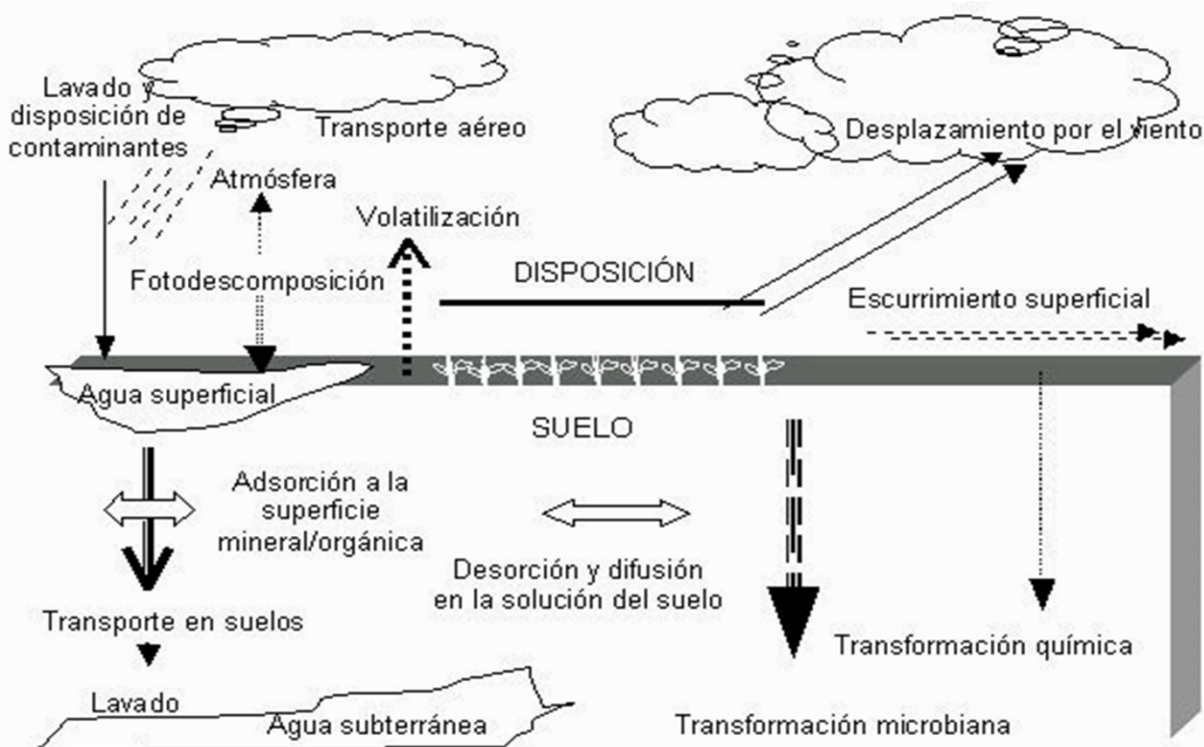


Figura 1. Esquema de dispersión de contaminantes por factores meteorológicos.

Inversión térmica

A nivel atmosférico el principal factor que influye en la dispersión de los contaminantes es el viento que presenta dos movimientos, uno es el horizontal y otro en vertical que depende del gradiente térmico (es decir cuando se asciende un metro en altura, la temperatura disminuye un grado). Al ascender en altura y disminuir la temperatura el aire se condensa, pesa más y baja al suelo. El suelo es calentado por la acción solar y por convección calienta el aire próximo al mismo, lo cual produce una expansión del mismo y al disminuir su densidad pesa menos y asciende, produciéndose una recirculación de aire mediada por la acción solar. Los contaminantes son emitidos en la parte baja de la atmosfera próximos al suelo y a continuación por la recirculación del aire estos contaminantes ascienden a capas superiores y son dispersados por la acción de los vientos en horizontal.

Dicha recirculación del aire se rompe al producirse el fenómeno de inversión térmica. Dicho fenómeno consiste en la colocación de una masa de aire de menor temperatura próxima al suelo que la capa de aire superior que presenta mayor temperatura (Figura 2). La presencia de una capa de inversión impide que se produzca la recirculación del aire dado que el aire más frío no va a ascender y los contaminantes atrapados en esta capa quedaran atrapados y se concentraran. La inversión térmica depende de la hora del día y de la estación del año dado que es producida por la nula o poca radiación solar. También influye la localización geográfica dado que las zonas de valles con menor irradiación solar son más propensas a este fenómeno.

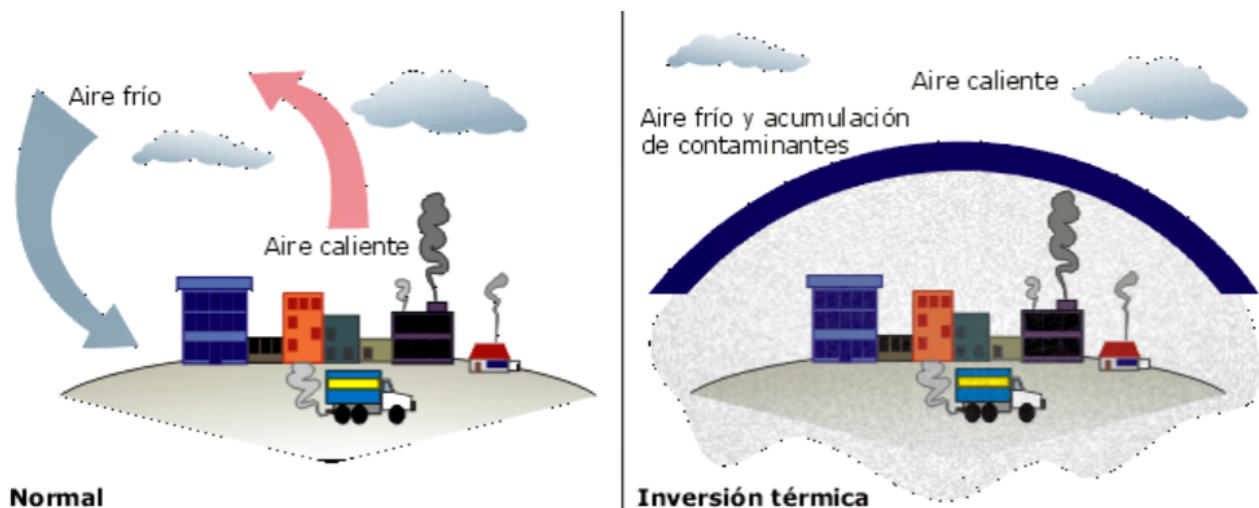


Figura 2. Esquema de inversión térmica.

CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

- Inorgánicos:

- Co, So, No, halógenos, metales e iones metálicos u otros.

- Orgánicos:

- hidrocarburos, oxidantes fotoquímicos

- Partículas

EXPRESIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS CONTAMINANTES

- Porcentaje en volumen (nº volúmenes del componente específico en 100 volúmenes de aire)
- ppm (mL/m³): 1ppm corresponde a un volumen de contaminante por un millón de volúmenes de aire.
- Los mg/m³ proporcionan la masa de contaminante contenida en 1 m³ de aire.

$$\text{mg/m}^3 = \frac{\text{ppm} \times \text{PM}}{24,04}$$

CONTAMINANTES DERIVADOS DEL CARBONO

El carbono presenta un ciclo natural en la atmosfera (Figura 3). Existen dos gases en la atmosfera procedentes de diferentes fuentes naturales que son el monóxido de carbono (CO) y el dióxido de carbono (CO₂). Además, por la actividad del antropogénica existe adicional de óxidos de carbono al ciclo del carbono aunque dicho aporte es muy inferior al aportado por las fuentes naturales, pero presenta efectos dañinos sobre los el medioambiente por alterar las proporciones normales en la atmosfera. El CO presenta diversas fuentes naturales, siendo la primera fuente la degradación del metano atmosférico y la segunda los océanos. Las fuentes antropogénicas de deben fundamentalmente a la combustión incompleta de compuestos carbonados o a la disociación del CO₂ entre otras causas.

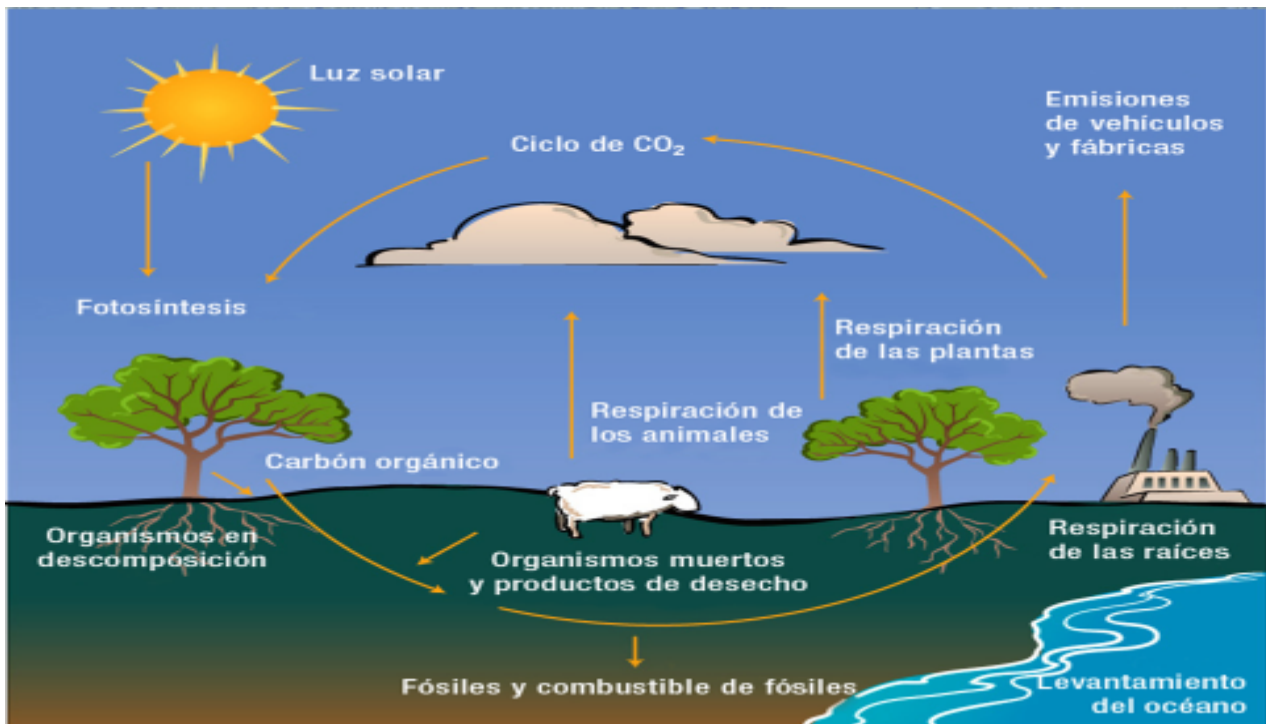


Figura 3. Ciclo del Carbono.

El CO es un gas tóxico para los animales y el hombre, no produciendo efectos perjudiciales a las plantas o sobre los materiales. El CO es un gas que tiene una afinidad por la hemoglobina 200 veces superior al O₂, lo cual conduce al desplazamiento del mismo y que se forme un compuesto que es la carboxihemoglobina, reduciendo el transporte de oxígeno a los tejidos. Dependiendo del porcentaje de carboxihemoglobina se producen diferentes alteraciones fisiológicas hasta llegar a la muerte.

Con respecto al CO₂, se ha relacionado con la generación del conocido como efecto invernadero (Figura 4). Existen diferentes gases de efecto invernadero entre los que se encuentra el CO₂, pero el que se está incrementado su concentración en la atmósfera de manera constante desde la revolución industrial es el CO₂. Los gases de efecto invernadero absorben parte de la radiación solar llegando a la superficie terrestre fundamentalmente la que se encuentra en la gama del visible. Cuando se enfría la superficie por la noche esta emite radiación infrarroja que es absorbida por gases de efecto invernadero como el CO₂ incrementado la temperatura de la tierra. El efecto invernadero es necesario porque si no la temperatura media de la tierra sería bastante inferior, pero un exceso está produciendo unas alteraciones en los climas, las cosechas, deshielo en los polos, desplazamiento de vectores de enfermedades y aparición de las mismas en otras localizaciones etc.



Figura 4. Esquema del efecto invernadero.

Por este motivo, para dar una respuesta global a este y diferentes problemas de contaminación ambiental surgieron las Cumbre de la Tierra, siendo la primera en Estocolmo (1972), y de forma particular se formó la Convención Marco sobre Cambio Climático en 1994 y se desarrollaron sucesivas convenciones para intentar evitar dichos problemas, llegando a acuerdos como los obtenidos en el protocolo de Kioto y otros posteriores para reducir las emisiones de CO₂ a nivel mundial y así poder evitar los efectos dañinos sobre el medio ambiente.

CONTAMINANTES DERIVADOS DEL NITROGENO

El nitrógeno presenta su ciclo natural en el medio ambiente (Figura 5), siendo las fuentes naturales de nitrógeno las que más contribuyen al ciclo, sin embargo las fuentes antropogénica suponen un gran peligro por los componentes tóxicos que se generan y por la concentración de contaminantes emitidos en espacios reducidos como suelen ser las ciudades. A nivel atmosférico existen fundamentalmente 3 óxidos de nitrógeno, que son el óxido nitroso (N₂O), el óxido nítrico (NO), y el dióxido de nitrógeno (NO₂). La principal fuente antropogénica de óxidos de nitrógeno son los procesos de combustión, produciéndose siempre en menor cantidad el NO₂ que el resto de óxidos de nitrógeno (menos del 10%).

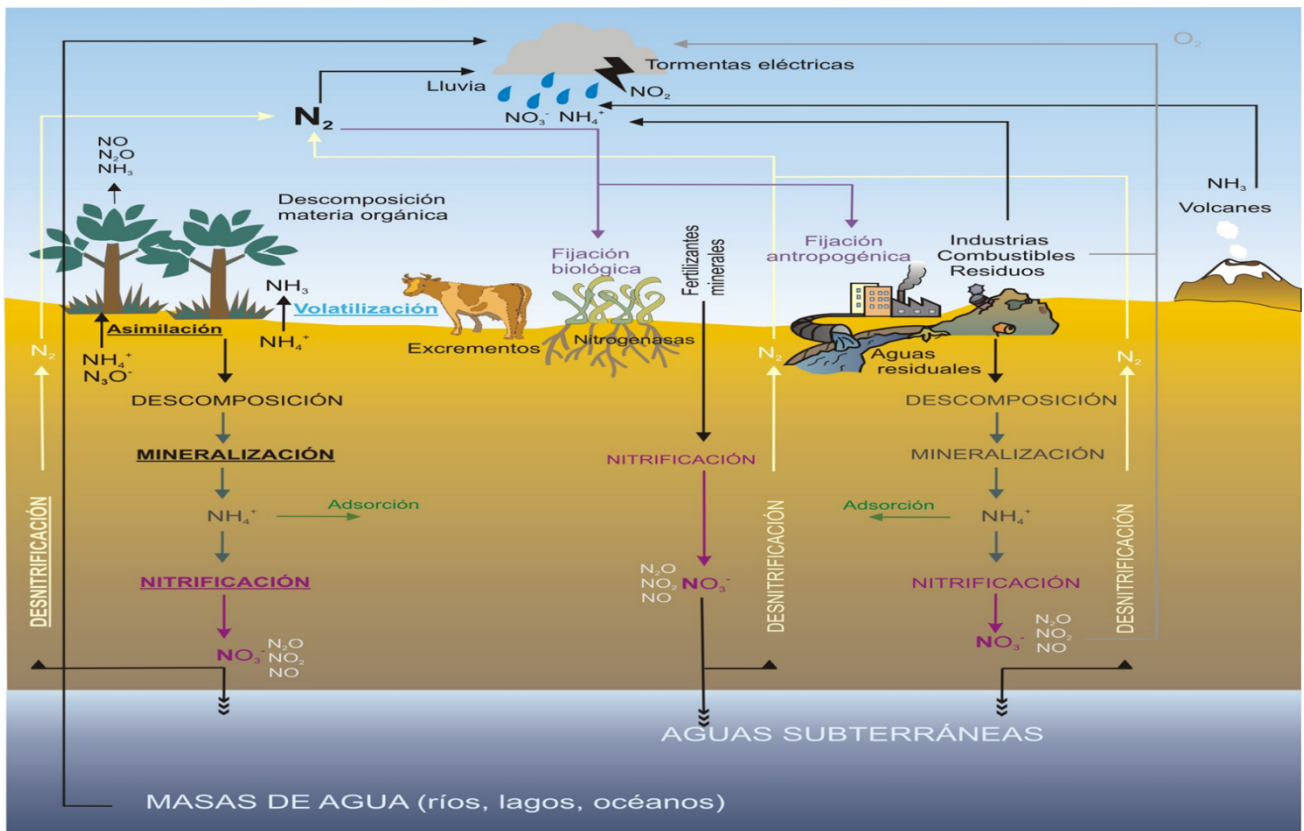


Figura 5. Esquema ciclo del nitrógeno.

Los óxidos de nitrógeno también presentan un ciclo natural en la atmósfera mediado por la acción de los rayos solares (Figura 6). Desde el punto de vista toxicológico solo tienen importancia el NO y el NO_2 , siendo este último 4 veces más tóxico que el óxido nítrico. Además, hay que tener en cuenta en la peligrosidad de estos dos óxidos que su aporte antropogénico es importante y que participan en las reacciones fotoquímicas en la atmósfera. En este sentido, la presencia de otros contaminantes en la atmósfera como agentes oxidantes, hidrocarburos, metales... u otros, puede desencadenar que el ciclo atmosférico del nitrógeno se desequilibre incrementándose la formación de NO_2 , o inducir la formación de otros compuestos oxidantes tóxicos por la reacción de NO_2 con los hidrocarburos dando lugar a los nitratos de peroxiacilo (NPN).

Los efectos tóxicos descritos para el NO y el NO_2 tanto en animales como en el hombre se producen fundamentalmente sobre el aparato respiratorio, pudiendo ocasionar la muerte en la mayoría de las especies por encima de 100 ppm. También se ha descrito que presentan efectos tóxicos sobre las plantas dañando las hojas y reduciendo la fotosíntesis.

Además, se ha descrito que el NO y el NO₂ originan daños sobre los materiales como en las fibras textiles, los tintes o en el cableado formado por aleaciones de cuproníquel.

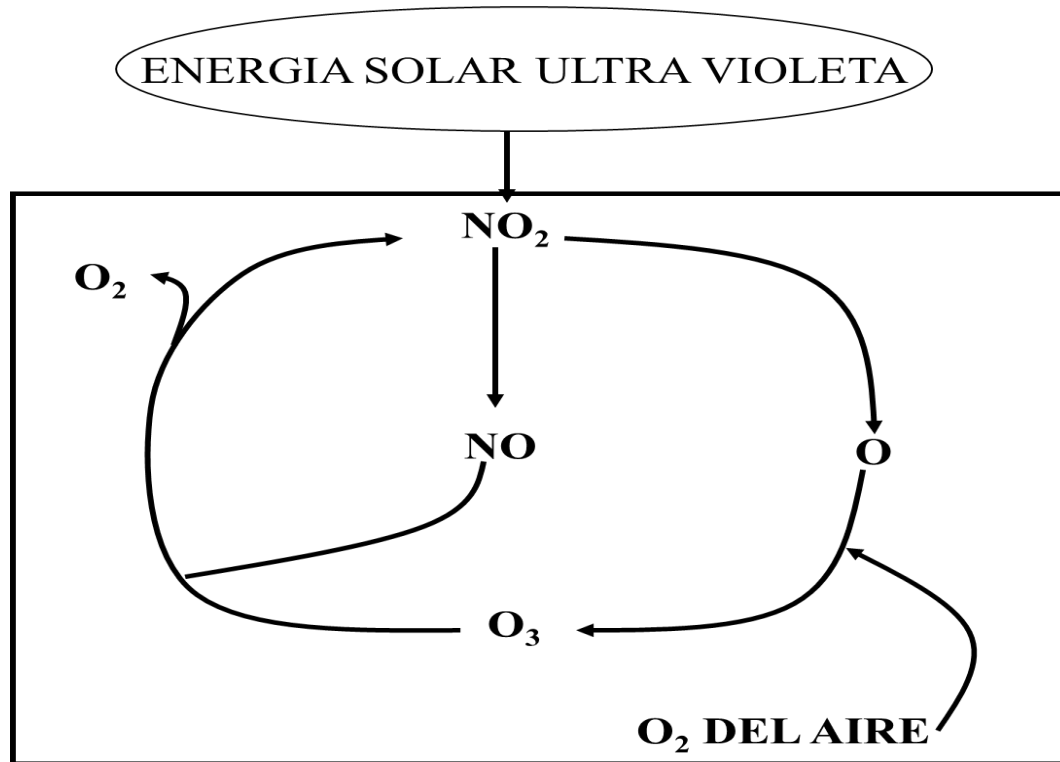


Figura 6. Esquema del ciclo fotoquímico de los óxidos de nitrógeno.

CONTAMINANTES DERIVADOS DEL AZUFRE

El azufre también presenta un ciclo natural en el medioambiente (Figura 7). A nivel atmosférico existen fundamentalmente dos óxidos de azufre, que son el dióxido de azufre (SO₂) y el trióxido de azufre (SO₃). La principal fuente de óxidos de azufre es natural a través de la descomposición de la materia orgánica dando sulfuro de hidrógeno (H₂S) que es oxidado hasta SO₂. Los aportes antropogénicos se generan principalmente a través de la combustión de compuestos azufrados. Siempre se forma SO₂ en gran proporción y en menor proporción SO₃ (1-10%), lo cual es importante debido a la mayor peligrosidad del SO₃ que además en presencia de humedad se transforma en ácido sulfúrico. Sin embargo, debido a la presencia de otros contaminantes como metales pesados pueden incrementar la conversión por oxidación del SO₂ a SO₃, incrementándose la peligrosidad de la mezcla sobre los seres vivos expuestos.

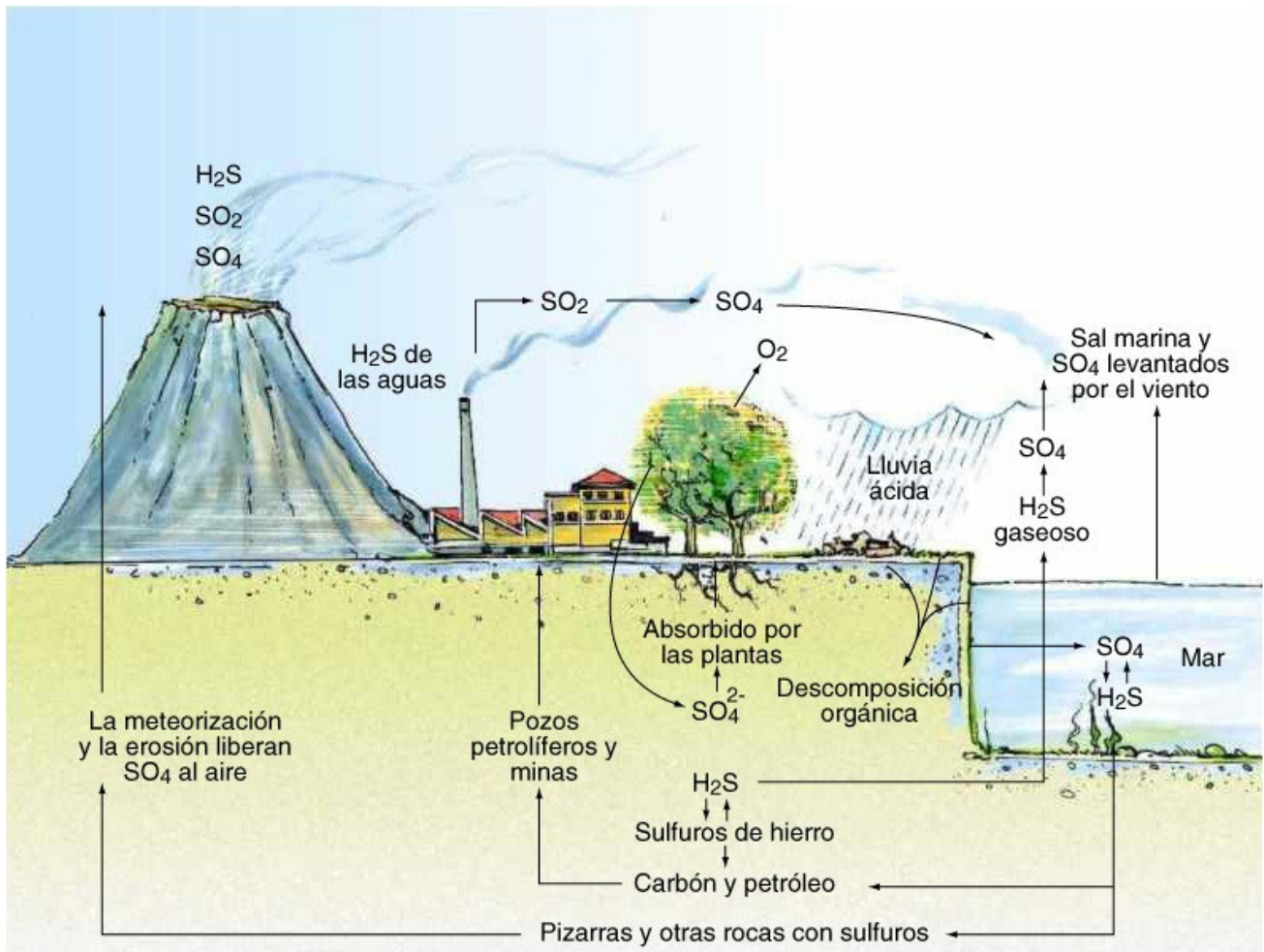


Figura 7. Esquema del ciclo del azufre.

Uno de los principales problemas que se ha asociado a las emisiones antropogénicas de óxidos de azufre en los países industrializados es la generación de la lluvia ácida mediada por el ácido sulfúrico formado a partir del SO_3 , produciendo un daño sobre la vegetación tras periodos prolongados de exposición a la misma, acidificación del suelo, de las aguas etc. Se ha descrito que los óxidos de azufre presentan una mayor toxicidad sobre las plantas que sobre los animales u el hombre, dañando sus hojas y el aparato fotosintético. En los animales y el hombre se han descrito fundamentalmente alteraciones respiratorias, también neurológicas por exposición a estos compuestos, pero debido a la dificultad que presentan las moléculas de estos óxidos para penetrar profundamente a nivel pulmonar por su tamaño su absorción es baja no produciendo mayores efectos de toxicidad. La peligrosidad se incrementa cuando la respiración se realiza por la boca en lugar de por la nariz dado que permite que las partículas penetren mejor a nivel pulmonar, siendo especialmente vulnerables la población con problemas respiratorios.

También se ha descrito que los óxidos de azufre producen alteraciones sobre los materiales. En este sentido, se ha descrito que modifican el secado y tiempo de endurecimiento de algunas pinturas influyendo en su durabilidad, aumentan la velocidad de corrosión de la mayoría de los metales y, especialmente el hierro, acero y cinc. Además, las concentraciones elevadas de H_2SO_4 son capaces de atacar una amplia gama de materiales para la construcción (mármol, caliza, cuero, papel).

PROBLEMAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Se han producido una serie de catástrofes medioambientales que se podrían haber evitado si se hubieran establecido medidas de control y de seguimiento, así como una evaluación impacto ambiental de las actividades industriales antes de que se hubieran puesto en marcha. Algunos ejemplos a nivel global son:

- Desastre de Bhopal: se originó el 3 de diciembre de 1984 en la India al producirse una fuga de 42 toneladas de isocianato de metilo. No existían medidas de seguridad y control para gestionar las posibles consecuencias de la liberación de los productos o residuos producidos sobre los trabajadores y la población.
- Enfermedad de Itai-Itai: se produjo en Japón, como consecuencia de la contaminación de las aguas de un río por una industria minera principalmente con cadmio que ocasionó la contaminación de los cultivos de arroz dando lugar a la intoxicación de la población por consumo de dicho arroz. No existían medidas de control y protocolos de gestión de los residuos generados por la empresa minera.
- Accidente de Seveso: Se originó el 9 de julio de 1976 en la región de Lombardia (Italia) en el municipio de Seveso, al producirse la fuga de una nube tóxica que contenía entre otras sustancias tóxicas la dioxina TCDD en la planta Icmesa de grupo Roche. Dicho accidente se produjo por la falta de medidas de seguridad que controlaran los procesos de producción, ni planes de vigilancia y control de escapes así como de planes de contingencia para la protección de los empleados y la población.

EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL

Hay dos sistemas de gestión ambiental, la Evaluación del Impacto Ambiental (EIA), que es un procedimiento a priori, que intenta evitar que se ponga en marcha una actividad que pueda producir efectos perjudiciales sobre el medioambiente evaluando los posibles efectos que puede desencadenar y el otro sistema son las Ecoauditorias, que son una a posteriori, que evalúa una vez en funcionamiento una actividad si esta se ajusta a la regulación y normativa exigida en materia medioambiental y propone planes de mejora de gestión medioambiental evitando que pueda generar algún daño sobre el medioambiente.

La Evaluación del Impacto Ambiental (EIA) es un procedimiento jurídico-administrativo de recogida de información, análisis y predicción destinado a anticipar, corregir y prevenir los posibles efectos directos e indirectos que la ejecución de una determinada obra o proyecto causa sobre el medio ambiente. Permitiendo a la Administración adoptar las medidas adecuadas a su protección.

La Evaluación de Impacto Ambiental valorará los efectos directos e indirectos de cada propuesta de actuación sobre la población humana, la fauna, la flora, la gea, el suelo, el aire, el agua, el clima, el paisaje y la estructura y función de los ecosistemas previsiblemente afectados.

La EIA se rige por el Real Decreto-ley 9/2018, de 5 de diciembre que modifica el RD Ley 21/2013, de 9 de diciembre, según el cual deberán someterse a Evaluación de Impacto Ambiental cualquier actuación, pública o privada, consistente en la realización de las obras, instalaciones, planes y programas o cualquier actuación comprendida en el Anexo I de dicho decreto por el procedimiento ordinario.

Si la actuación está comprendida en el Anexo II, se deberá someterse a EIA por procedimiento simplificado aportando el informe de impacto ambiental. En el anexo II están recogida todas las actividades que revierte menor peligrosidad y en el anexo I las más peligrosas. Las actividades pueden ser las mismas, y en esos casos la diferencia estriba en el volumen (cuanto más volumen de producción, mayor peligrosidad).

En el RD Ley 21/2013, de 9 de diciembre se establece a diferencia de disposiciones anteriores que las actividades recogidas en el anexo II debían de pasar obligatoriamente una EIA por el procedimiento simplificado y además

que si el volumen de producción para una misma industria erradicada en distintas comunidades autónomas que no para del volumen indicado en el anexo II debía de pasar EIA por el procedimiento ordinario si a suma de todos los volúmenes producidos en las diferentes comunidad autónomas superaba lo especificado en el anexo I.

El órgano administrativo competente

Cuando se trate de proyectos cuya repercusión no sobrepase el ámbito territorial de una Comunidad Autónoma, el órgano ambiental competente será el que determine la Comunidad Autónoma.

Cuando un proyecto pueda tener repercusiones sobre el medio ambiente de más de una Comunidad Autónoma, deberá ser autorizado o aprobado por la Administración General del Estado, siendo en este caso el Ministerio de Medio Ambiente el órgano ambiental competente.

Informe

El informe que se realiza tiene que ser muy pormenorizado. Debe incluir:

- a) Descripción general del proyecto y exigencias previsibles en el tiempo, en relación con la utilización del suelo y de otros recursos naturales. Estimación de los tipos y cantidad de residuos vertidos y emisiones de materia o energía resultantes.
- b) Una exposición de las principales alternativas estudiadas y una justificación de las principales razones de la solución adoptada, teniendo en cuenta los efectos ambientales.
- c) Evaluación de los efectos previsibles directos o indirectos del proyecto sobre la población, la fauna, la flora, el suelo, el aire, el agua, los factores climáticos, el paisaje y los bienes materiales, incluido el patrimonio histórico-artístico y el arqueológico.
- d) Medidas previstas para reducir, eliminar o compensar los efectos ambientales significativos.
- e) Programa de vigilancia ambiental.
- f) Resumen del estudio y conclusiones en términos fácilmente comprensibles. Informe, en su caso, de las dificultades informativas o técnicas encontradas en la elaboración del proyecto.

Declaración de Impacto ambiental

Es el pronunciamiento del órgano ambiental que determinará, a los solos efectos ambientales, la conveniencia o no de realizar el proyecto y en su caso, fijará las condiciones en que debe realizarse, en orden a la protección del medio ambiente y de los recursos naturales, teniendo en cuenta a este fin las previsiones contenidas en los planes ambientales vigentes.

La Declaración de Impacto Ambiental incluirá las consideraciones apropiadas para realizar el seguimiento ambiental de la ejecución, desarrollo o funcionamiento y, en su caso, clausura de la actuación evaluada, de conformidad con el programa de vigilancia, prescripciones de control o criterios de seguimiento establecidos.

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Indique cuál es la normativa actual por la que se rige la Evaluación del Impacto Ambiental.

2. Según esta normativa, ¿se puede establecer una planta para la elaboración productos lácteos que se prevé que reciba más de 200 toneladas de leche/día sin necesidad de realizar una evaluación de impacto ambiental?. Razone la respuesta.

3. Se sabe que los trabajadores de una industria esta expuestos diariamente a anilina en niveles de 8,6 mg/m³, a n-butylmercaptano en niveles de 4,5 mg/m³, y a ácido fórmico en niveles de 6 mg/m³ durante toda la jornada laboral (8 horas). Indique si los trabajadores están expuestos a niveles superiores a los permitidos en el ambiente laboral, sabiendo que el máximo para estos niveles son de 2 ppm para la anilina, 0,5 ppm para el n-butylmercaptano y 5 ppm para el ácido fórmico.

Pm anilina: 93,13

Pm n-butylmercaptano: 90,19

Pm ácido fórmico: 46,03

4. Para el ejemplo anterior, indicar en aquellos compuestos que superen los valores permitidos, que posibles efectos tóxicos se pueden producir sobre los trabajadores expuestos.

5. Citar cinco cumbres sobre el cambio climático y el medio ambiente.

6. Citar cinco crisis ambientales mundiales y el lugar en el que se produjeron.

3.2. Ensayos de toxicidad. Modelos y cálculos de índices de toxicidad.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los tóxicos, la magnitud de la respuesta biológica está relacionada con la dosis, por lo tanto, se puede definir matemáticamente la relación entre dosis y respuesta.

Igualmente, no todos los animales responden igual ante la misma exposición. Para tener presente este hecho la relación dosis-respuesta debe contener una medida de variabilidad que refleje las medidas inherentes en las respuestas esperadas entre los animales, como, por ejemplo, las desviaciones típicas, el error standard, etc.

La relación dosis-respuesta que se aplica más comúnmente es la DL_{50} que se define como la dosis de sustancia capaz de matar al 50% de los individuos que la han recibido.

ENSAYOS DE TOXICIDAD

Como no es frecuente que se disponga de suficientes animales para realizar experiencias con muchas dosis por el gasto que supondría y por el sacrificio innecesario de animales, se realiza primero un tanteo con 2 animales por grupo, por ejemplo, a dosis de 1, 10, 100, 1000 mg/kg.

1 mg/kg p.c.	0 muertos
10 mg/kg p.c.	0 muertos
100 mg/kg p.c.	1 muerto
1000 mg/kg p.c.	2 muertos

Por lo tanto tenemos que emplear dosis a partir de 10 mg/kg p.c. como punto de partida. A partir de aquí utilizamos dosis que sigan una progresión geométrica, es decir que sigan la fórmula:

$$Y_N = Y_1 R^{N-1}$$

Y_N = Dosis enésima

Y_1 = Primera dosis

R = Factor de progresión, distinto siempre de 0 y de 1

N = Dosis consecutivas

De tal forma que en este ejemplo:

$$\text{Dosis 1} = Y_1 = 10 \text{ mg/kg} \quad R = 2$$

$$\text{Dosis 2} = Y_2 = 10 \times 2^1 = 20 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Dosis 3} = Y_3 = 10 \times 2^2 = 40 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Dosis 4} = Y_4 = 10 \times 2^3 = 80 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Dosis 5} = Y_5 = 10 \times 2^4 = 160 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Dosis 6} = Y_6 = 10 \times 2^5 = 320 \text{ mg/kg}$$

Cuando experimentamos con estas dosis obtenemos unos resultados y aplicamos métodos matemáticos para la resolución de la DL_{50} por los distintos métodos que veremos a continuación.

METODO DE REED-MUENCH

Es uno de los métodos más sencillos. Puede realizarse por procedimientos gráficos o aritméticos. Se emplean valores acumulativos y los cálculos se realizan teniendo solo en cuenta los valores próximos al 50% de letalidad/mortalidad, calculando la distancia proporcional de los porcentajes de letalidad y el logaritmo del incremento de las dos dosis adyacentes al 50% de letalidad.

Tomamos como ejemplo una dosis inicial de 50 mg/kg p.c., siendo las dosis consecutivas, por tanto, de 100, 200 y 400 mg/kg p.c.

Dosis mg/kg p.c.	Valores reales		Valores acumulativos		Total (M+V) acumulativos	% letalidad de los valores acumulativos
	M	V	M	V		
50	0	10	0	(9+10)=19	(0+19)=19	0
100	2	8	(0+2)=2	(1+8)=9	(2+9)=11	18,18
200	9	1	(2+9)=11	(0+1)=1	(11+1)=12	91,66
400	10	0	(11+10)=21	0	(21+0)=21	100

A continuación aplicamos la siguiente fórmula para el cálculo de la DL₅₀:

$$\text{Log DL}_{50} = \log \text{ dosis inferior} + (\mathbf{B} \times \log \mathbf{A})$$

Siendo A = dosis superior/dosis inferior

$$B = \frac{50 - \% \text{ dosis inferior}}{\% \text{ dosis superior} - \% \text{ dosis inferior}}$$

En primer lugar buscamos el valor de **B** que es la distancia proporcional de porcentajes continuos al 50%. Estos porcentajes, en este caso serán 18,18 y 91,66 que corresponden a las dosis de 100 y 200 mg/kg p.c.

$$B = \frac{(50 - 18,18)}{91,66 - 18,18} = \frac{31,82}{73,48} = \mathbf{0,4330}$$

A continuación buscamos el logaritmo del incremento de dosis contiguas al 50% de letalidad que en la fórmula corresponde con el logaritmo de A (log A). Estas dosis corresponden en nuestro ejemplo a 100 (dosis baja) y 200 mg/kg p.c. (dosis alta).

$$\frac{\text{Dosis mayor}}{\text{Dosis menor}} = \frac{200}{100} = \mathbf{2} = \mathbf{A} \qquad \log 2 = \mathbf{0,3010} = \log \mathbf{A}$$

En realidad lo que estamos buscando es el logaritmo del factor de progresión que es el número que nos relaciona las dosis.

A continuación multiplicamos los dos valores obtenidos y sumamos el logaritmo de la dosis menor adyacente al 50% de letalidad.

$$\begin{array}{rcl}
 \log 100 & = & 2,0000 & (\log \text{ dosis inferior}) \\
 + \frac{0,4330 \times 0,3010}{2,1303} & = & 0,1303 & + \frac{(B \times \log A)}{\text{Log DL}_{50}} \\
 \hline
 & & 2,1303 &
 \end{array}$$

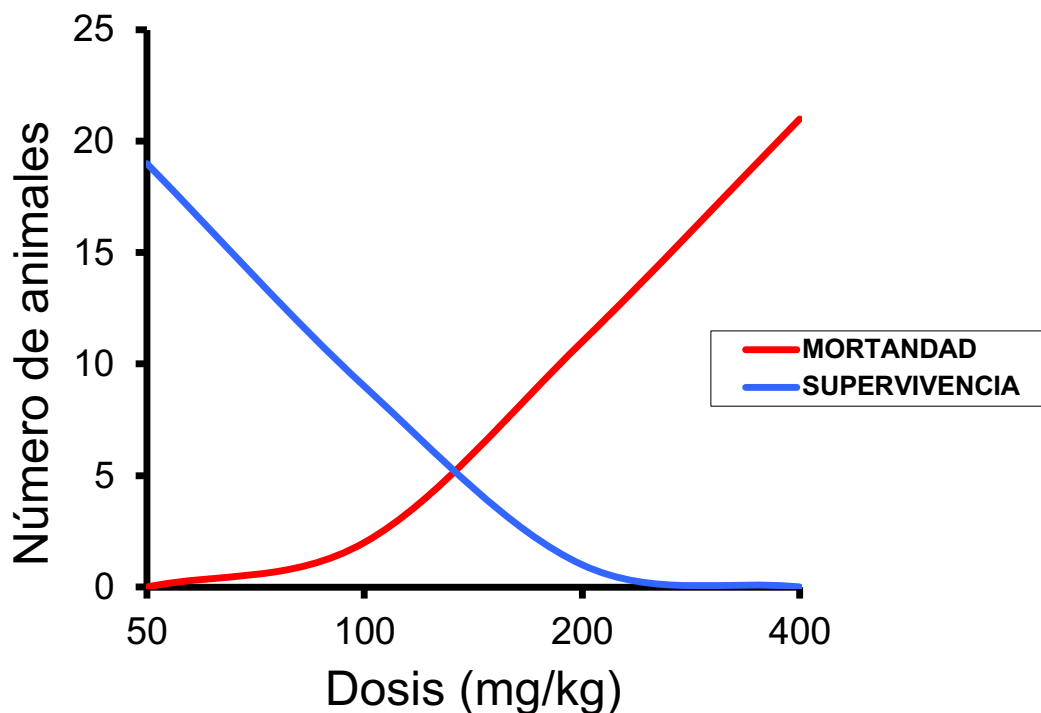
Por lo tanto, $\text{Log DL}_{50} = 2,1303$

Como el valor que nos interesa es la dosis letal 50, no su logaritmo, en último lugar buscamos el antilogaritmo del número resultante y nos dará la DL_{50} .

$$\text{Antlog } 2,1303 = 134,9895 \text{ mg/kg} = \text{DL}_{50}$$

Mediante este método no podemos calcular el error estándar ni ningún otro parámetro de variabilidad.

La variante gráfica de este método nos permite calcular de una manera rápida la DL_{50} aproximada de un compuesto. Se representan en abscisas las dosis y en ordenadas por una parte la supervivencia acumulativa y por otra parte la mortandad acumulativa. Son dos curvas que se cortan en un punto que es la DL_{50} .

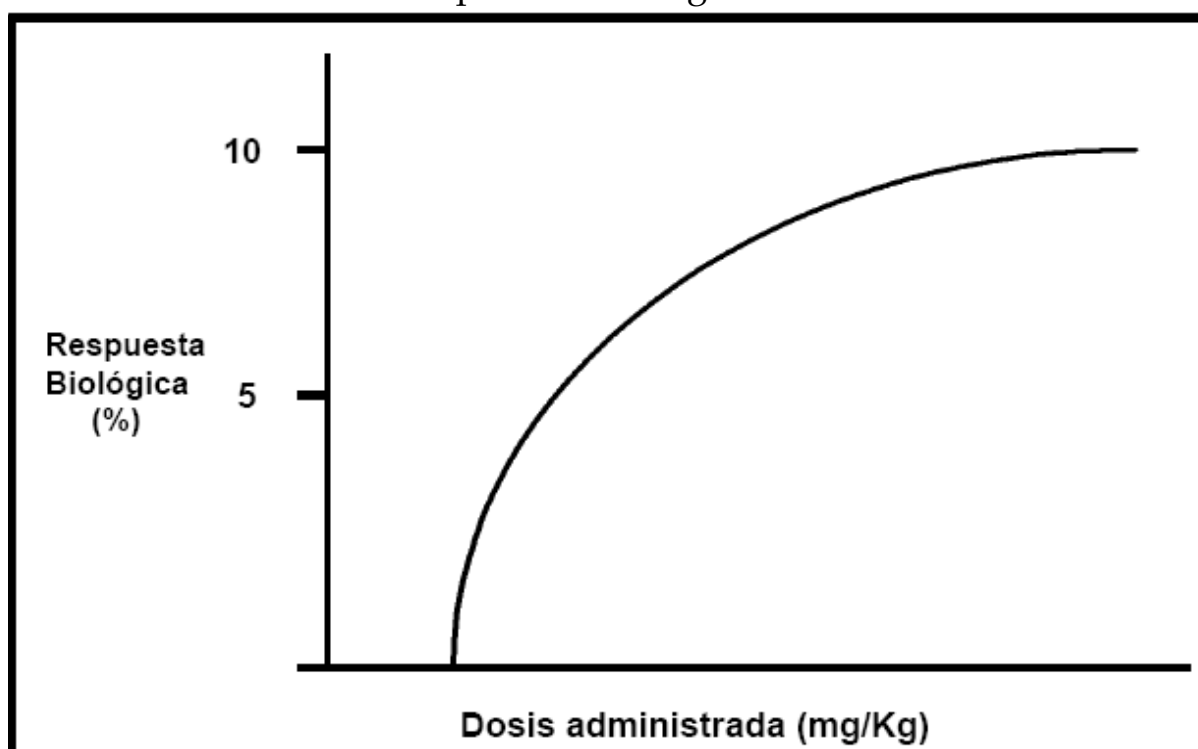


MÉTODO DE MILLER Y TAINTER

Este método es hoy en día uno de los más utilizados a la hora de estudiar cualquier relación dosis-respuesta, y en Toxicología la relación dosis-respuesta más utilizada o estudiada es la relación dosis-porcentaje de mortandad, determinando así la DL_{50} . Las razones por las que se ha planteado este método gráfico-matemático, son las siguientes:

Como hemos visto al principio de realizar estudios de determinación de la DL_{50} (por ejemplo, el método de Reed-Muench), se venían representando en una gráfica utilizando papel milimetrado, donde en ordenadas se representaba el % de letalidad y en abcisas la dosis, y así obtenían una curva análoga a la de la curva de Gauss; esta curva tiene forma sigmoidea asimétrica.

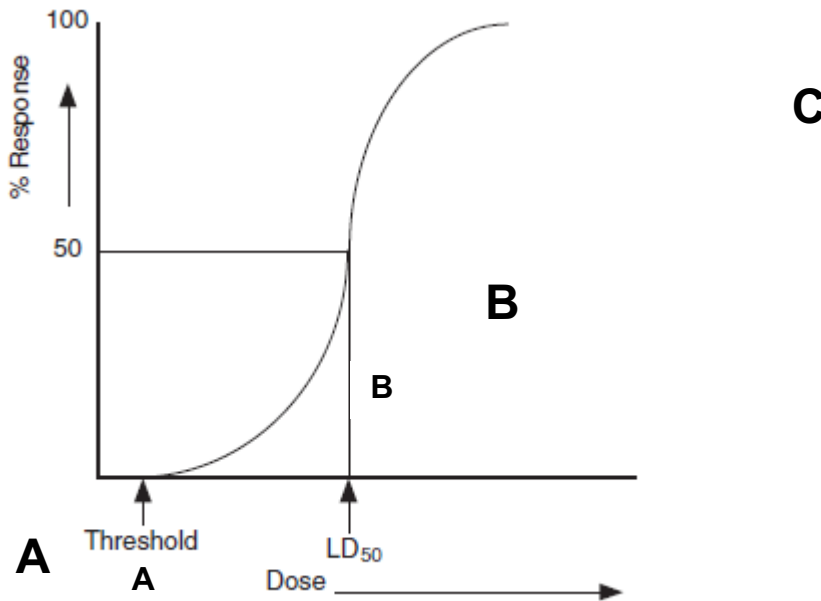
Curva dosis-respuesta sin ninguna transformación



Tomada de Toxicología de los alimentos, 2000. P. Valle y B.L. Florentino

Esto es debido a que el aumento de mortalidad no viene dado en la misma proporción que el aumento de la dosis. Así un aumento de la mortalidad en un 10% para pasar por ejemplo del 30% al 40%, se produce solamente cuando los estímulos, en este caso la dosis del tóxico, aumentan en una proporción constante y no en una cantidad igual.

Esta representación puede mejorarse, obteniendo una curva simétrica, tipo sigmoide, empleando en abscisas logaritmos de dosis en vez de dosis.



Tomada de Fundamental Toxicology J.H. Duffus y H.G.J. Worth. 2006

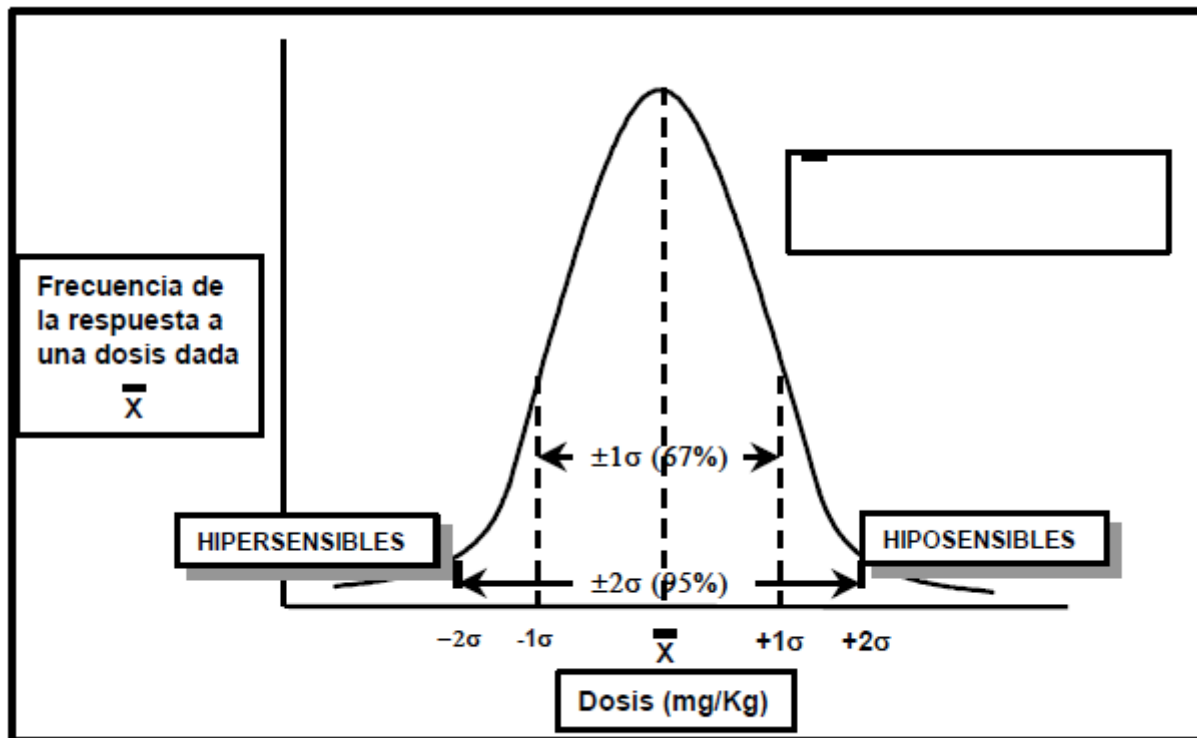
Traven (1927) estableció este tipo de curvas de “porcentajes de mortalidad” o “porcentajes de respuesta”. Se observa en la figura que con una dosis inferior a A no muere ningún animal. La dosis A representa la Dosis Letal Mínima (DL_{01}). La dosis B, a la que mueren el 50% de los animales, es la DL_{50} y como se ve es la que puede determinarse con mayor precisión ya que una pequeña desviación de la dosis determina una mayor variación en el porcentaje de animales muertos. Por ellos la DL_{50} es el parámetro más empleado para caracterizar la toxicidad de una sustancia. La dosis C representa aquella en que el 100% de los animales han muerto, es la DL_{100} .

El número de animales utilizados para determinar una curva de este tipo es bastante elevado. Se consideran necesarios lotes mínimos de 10 animales por dosis. El trazado de la curva para ser fiable requiere de 6 a 7 puntos por lo que se necesitarían entre 80-100 animales y esto encarecía considerablemente la investigación.

Con el objeto de simplificar el estudio de la DL_{50} , Bliss por una parte y Miller y Tainter por otra, estudiaron la posibilidad de transformar estas curvas en rectas mediante una aproximación matemática. El trazado de una línea recta requiere menos puntos, 3 ó 4, con lo que se reduciría el número de animales utilizados en el estudio y la determinación de la DL_{50} sería más exacta. Un simple método estadístico permite determinar la línea recta más apropiada correspondiente a los puntos obtenidos. Esta modificación se conoce con el nombre de “Transformación probit”.

La Transformación probit está basada en la hipótesis de que la sensibilidad o respuesta de los sujetos de la población expuesta frente a la Dosis (efecto) estudiada, sigue una distribución normal o curva de Gauss. La experiencia ha demostrado que las gráficas de frecuencias teóricas, en las cuales cada valor numérico (variable) se traza en función del número de veces (frecuencia) con la cual ocurre en una población dada, sigue en general una forma simétrica en forma de campana, llamada campana de Gauss.

Curva de frecuencia dosis-respuesta (variación intraespecie) (adaptada de Willians y Burton, 1985)



Tomada de Toxicología de los alimentos, 2000. P. Valle y B.L. Florentino

Porcentaje de respuesta %	Distribuciones equivalentes normales (DEN)	Unidades probit
0,1	-3	2
2,3	-2	3
15,9	-1	4
50	0	5
84,1	1	6
97,7	2	7
99,9	3	8

Los Probit son unidades de probabilidad. Se define el probit como la unidad de respuesta obtenida por la adición de 5 unidades a cada uno de los valores de la desviación equivalente normal, obtenida esta a su vez del porcentaje de respuesta obtenido, de tal forma que a un 50% de respuesta se le asigna un Probit 5. La relación entre el porcentaje de respuesta, desviación equivalente normal y Probit aparece donde el probit 5 es el punto medio es el punto medio de la curva normal de Gauss. Se necesita por lo tanto un papel llamado papel probit o papel logarítmico-probabilístico.

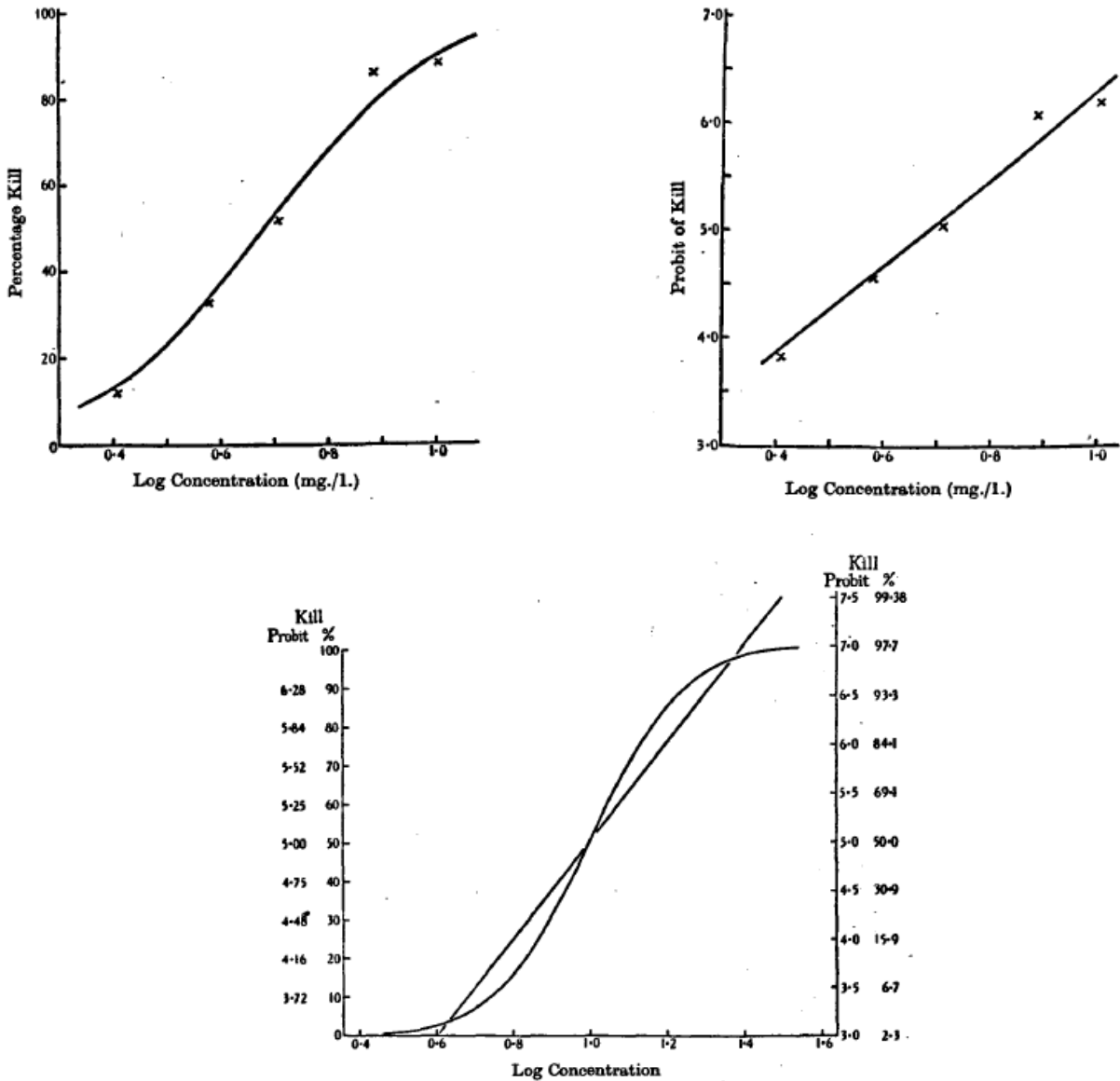
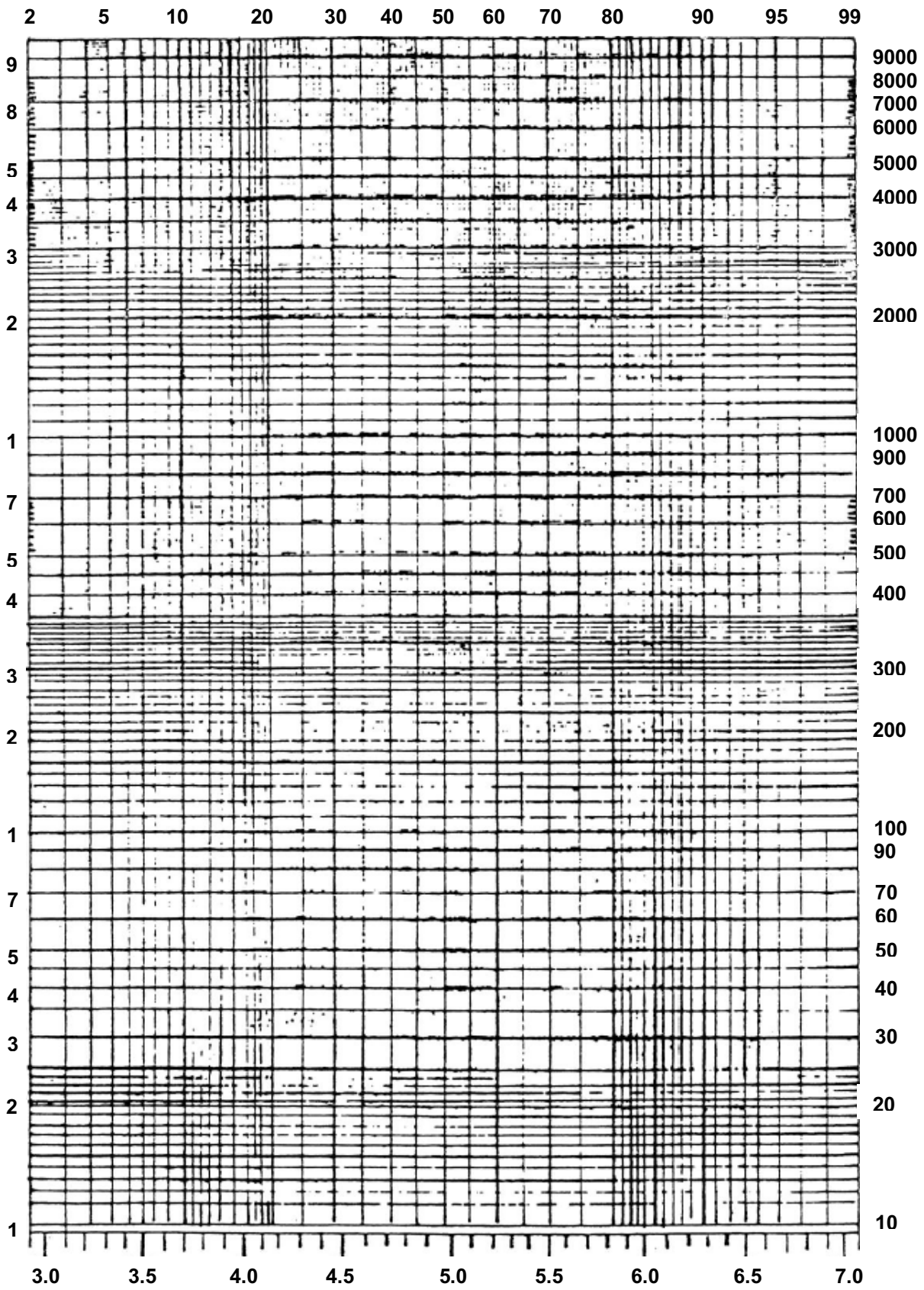


FIG. 5. Effect of the probit transformation. (The normal sigmoid curve of Fig. 4 is transformed to a straight line when the ordinates are measured on a linear scale of probits instead of percentages.)

Tomado de "Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. D. J. Finney, 1952"

PORCENTAJES



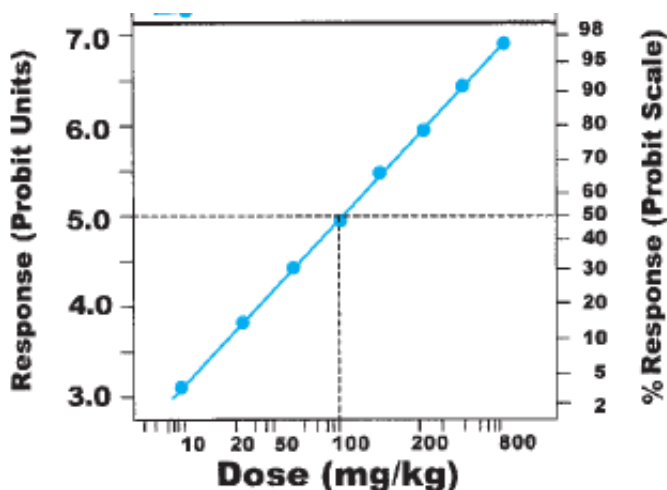
DOSIS

PROBITS

Las ventajas de este medio son varias:

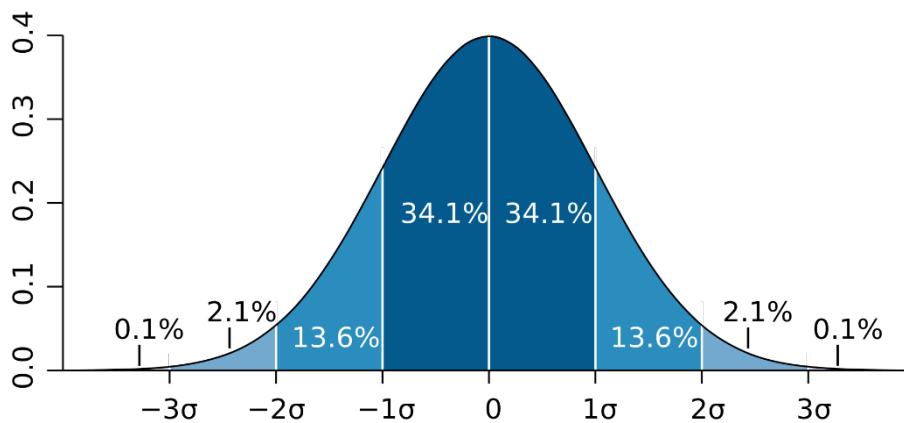
- Para determinar la DL_{50} utilizando el método de Miller y Tainter el número de animales utilizados en el estudio es mucho menor, ya que solo con 3 puntos podemos determinar una recta.
- Podemos calcular fácilmente la pendiente de la recta. Cuanto mayor es la dispersión de los resultados en función del logaritmo de la dosis, menor es la pendiente (a mayor pendiente mayor toxicidad). Esta pendiente puede considerarse en principio como una característica de la intensidad de la toxicidad para una sustancia.
- La utilización de los Probit simplifica extraordinariamente el cálculo, al convertir la curva dosis/respuesta en una recta que relaciona el logaritmo de la dosis con los Probit
- Por este método podemos calcular utilizando la gráfica, el error standard, una medida de variabilidad entre los animales que tenemos que tener en cuenta.

Para trazar la recta que nos indicará la DL_{50} , tomamos el papel Probit y representamos en el eje de abscisas, las dosis y en el eje de ordenadas los porcentajes de mortalidad. Trazamos la línea que mejor se adapte a los datos y la DL_{50} se determina mediante la dosis que corresponde con el Probit 5 (50%).



Tomado de Casarett and Doull's Toxicology. 2008

Con este método podemos calcular el error estándar de la media que es la desviación estándar de la población dividida por la raíz cuadrada del tamaño de la muestra. Esta medida cuantifica las oscilaciones de la media muestral (media obtenida en los datos) alrededor de la media poblacional (verdadero valor de la media).



Tomado de Wikipedia

P4 P5 P6

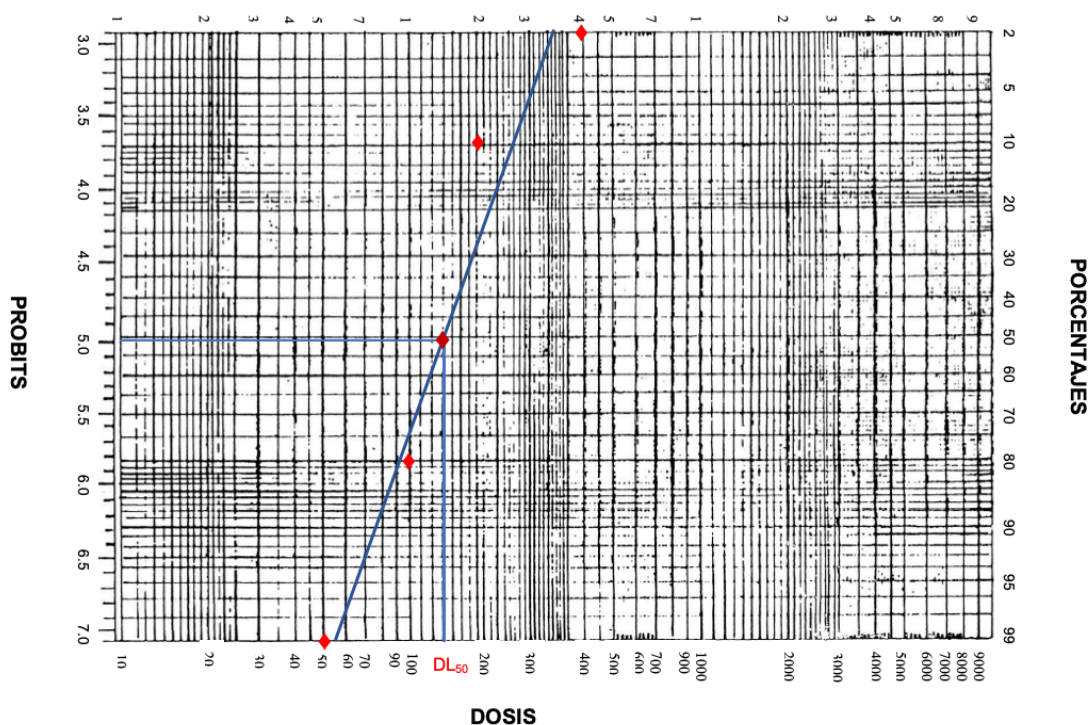
En nuestro caso la media poblacional correspondería al valor del P5 y para calcular el valor de la desviación estándar tendríamos que determinar dos tipos de desviaciones, una a la derecha y otra a la izquierda que corresponderían con los valores obtenidos de P6 (84%) y P4 (16%). Restando el menor (Probit 6) del mayor (Probit 4) obtenemos un valor numérico correspondiente a dos desviaciones típicas (2s) y el error standard sería:

$$E.S. = \frac{2s}{\sqrt{2N}} = \frac{P4 - P6}{\sqrt{2N}}$$

N = Número de animales empleados entre las dosis correspondientes al Probit 3,5 y al Probit 6,5

Vamos a realizar el ejercicio que hemos resuelto por el método de Reed-Muench utilizando el método de Miller y Tainter.

Dosis mg/kg p.c.	Valores reales		% mortandad (valores reales)
	M	V	
50	0	10	0
100	2	8	20
200	9	1	90
400	10	0	100



El cálculo del error standard sería en este caso:

$$E.S. = \frac{190 - 88}{\sqrt{40}} = 16,13$$

Por lo tanto la DL_{50} sería igual a $130 \pm 16,13$ mg/kg

MÉTODO DE KARBEN

Es un método aritmético y en él se emplea el intervalo medio del número de muertes en cada grupo de animales y la diferencia entre dosis para el mismo intervalo. La DL_{50} se obtiene al restar de la dosis capaz de originar la muerte en todos los animales empleados un cociente que estará formado por la suma de productos de diferencias partida por el número de animales de cada grupo.

LOTES	1	2	3	4
Dosis (mg/kg p.c.)	50	100	200	400
Nº animales	10	10	10	10
Nº de muertos	0	2	9	10

A (Diferencia entre dosis)	50	100	200
----------------------------	----	-----	-----

B (Diferencia media entre muertos)	1	5,5	9,5
Producto A x B	50	550	1900
Suma del producto A x B	2500		

CÁLCULO

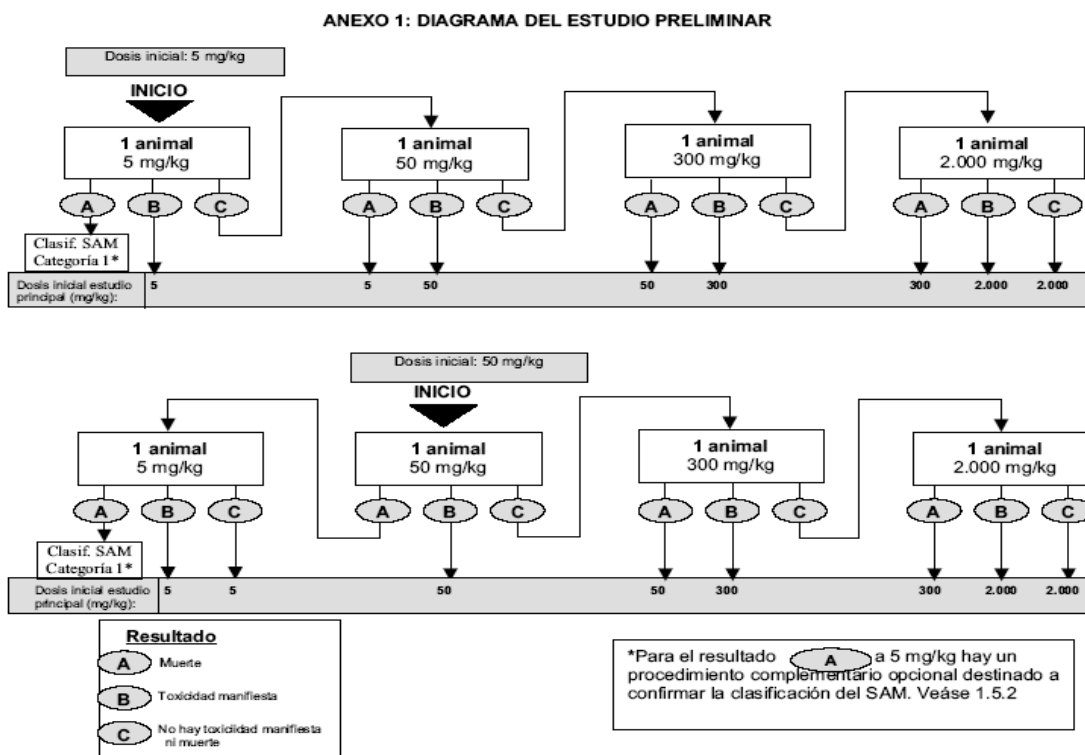
Dosis capaz de originar la muerte de un 100% de los animales = 400 mg/kg p.c.

$$DL_{50} = 400 - \frac{\text{Suma producto } A \times B}{N^{\circ} \text{ animales por lote}} = 400 - \frac{2500}{10} = 150 \text{ mg/kg p.c.}$$

MÉTODO DE DOSIS FIJA

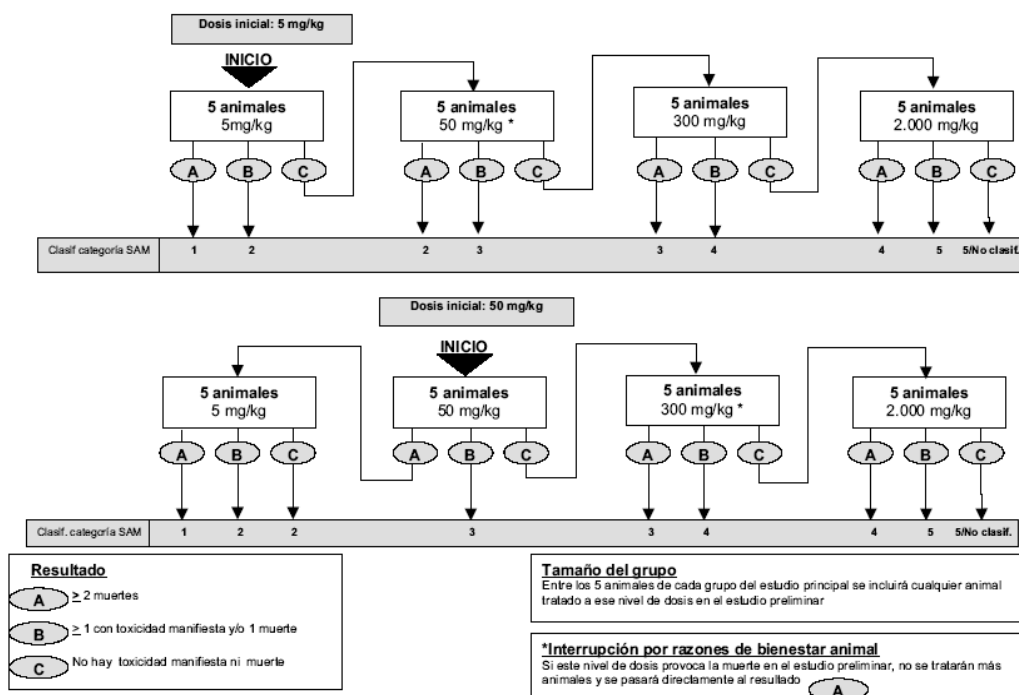
El método de dosis fija se lleva a cabo en ratas en dos fases:

En la primera se realiza un estudio preliminar, investigando de manera secuencial los efectos de varias dosis administradas por vía oral a ratas de un solo sexo (machos o hembras). El estudio preliminar proporciona información acerca de la relación entre dosis y toxicidad, así como una estimación de la dosis letal mínima (DL₀₁). No suelen utilizarse más de 1 animal por dosis en esta primera fase.



En el estudio principal, se administra a ratas la sustancia por vía oral a grupos de 5 animales del mismo sexo, en las dosis pre-establecidas (5, 50, 500 o 2000 mg/kg p.c.). La dosis utilizada en primer lugar será aquella determinada mediante el estudio preliminar capaz de producir “toxicidad manifiesta”, pero sin aparecer letalidad alguna.

ANEXO 2: DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRINCIPAL



Una vez administrada la sustancia se realizan observaciones sobre sus posibles efectos tóxicos. En caso de que la dosis inicial elegida produzca una toxicidad manifiesta, pero no la muerte, no será preciso realizar otras pruebas o ensayos.

En caso de que el nivel de dosis elegido no produzca toxicidad manifiesta, se deberá volver a administrar la sustancia al nivel de dosis inmediatamente superior. Si los animales mueren, o si es preciso sacrificarlos debido a una fuerte reacción tóxica en los mismos, se deberá volver a administrar la sustancia al nivel de dosis inmediatamente inferior.

Este procedimiento permite la identificación de la “dosis discriminante”, que es la mayor de las dosis pre-establecidas que se puede administrar sin que origine la muerte de los animales (incluyendo el sacrificio de los animales por manifestaciones tóxicas visibles).

DOSIS	RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
5 mg/kg p.c.	Supervivencia de menos del 100%	Compuestos que son MUY TÓXICOS
	Supervivencia del 100% pero toxicidad manifiesta	Compuestos que son TÓXICOS
	Supervivencia del 100% sin toxicidad manifiesta	Véanse los resultados con 50 mg/kg
50 mg/kg	Supervivencia de menos del 100%	Compuestos que pueden ser TÓXICOS o MUY TÓXICOS. Véanse los resultados para 5 mg/kg
	Supervivencia del 100% pero toxicidad manifiesta	Compuestos que son NOCIVOS
	Supervivencia del 100% sin toxicidad manifiesta	Véanse los resultados para 500 mg/kg
500 mg/kg	Supervivencia de menos del 100%	Compuestos que pueden ser TÓXICOS o NOCIVOS. Véanse los resultados para 50 mg/kg
	Supervivencia del 100% pero toxicidad manifiesta	Compuestos que se considera que no tienen toxicidad manifiesta aguda significativa
	Supervivencia del 100% sin toxicidad manifiesta	Véanse los resultados para 2000 mg/kg
2000 mg/kg	Supervivencia de menos del 100%	Véanse los resultados para 500 mg/kg
	Supervivencia del 100%, con o sin toxicidad manifiesta	Compuestos que no tienen una toxicidad aguda significativa

- Realizar un resumen de los siguientes documentos:

- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. (Solamente del ANEXO II. Requisitos relativos a los establecimientos y al alojamiento y al cuidado de los animales, Sección A: Sección general. Solo Páginas 28 a la 31)

- Reglamento (CE) nº 440/2008 de la Comisión, de 30 de mayo de 2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH). (Solamente de las páginas 145 a la 154)

- Calcular la dosis letal 50 por el método de Reed y Muench y por el método de Miller y Tainter con los siguientes datos:

Dosis mg/kg p.c.	Valores reales	
	Muertos	Vivos
40	0	10
80	2	8
160	7	3
320	10	0

