
*GUÍA DE PRÁCTICAS
DE LABORATORIO Y
SEMINARIOS DE
TOXICOLOGÍA
DE LOS ALIMENTOS*



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

EDITADO POR:

Prof. Paula Moyano-Cires Ivanoff

Prof. Eva Ramos Alonso

AUTORES:

Prof. Paula Moyano-Cires Ivanoff

Prof. Javier del Pino Sans

Prof. Alejandro Romero Martínez

Prof. María Teresa Frejo Moya

Prof. María Jesús Díaz Plaza

Prof. Eva Ramos Alonso

ISBN: 978-84-09-32029-5

ÍNDICE:

- 1. Normas de seguridad y buenas prácticas en el laboratorio**
- 2. Seminarios de Toxicología**
 - 2.1. Evaluación del riesgo medioambiental
 - 2.2. Ensayos de toxicidad. Modelos y cálculos de índices de toxicidad.
 - 2.3. Fuentes de información en Toxicología. Bases de datos.
 - 2.4. Toma de muestras. Normas para la recogida, preparación y remisión de muestras para la investigación químico-toxicológica.

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 practicas 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. *SEMINARIOS DE TOXICOLOGÍA*

2.1. 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 disciplina 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).

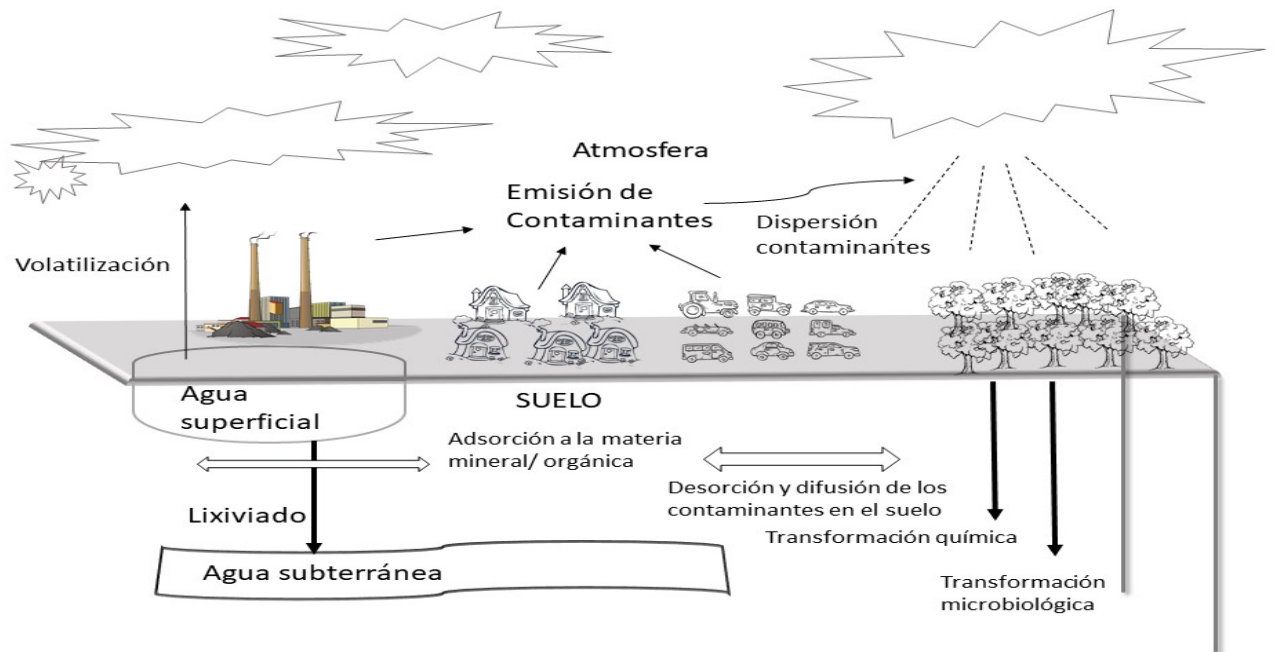


Figura 1. Esquema de dispersión de contaminantes por factores meteorológicos.

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 atmósfera 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 quedarán atrapados y se concentrarán. 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.

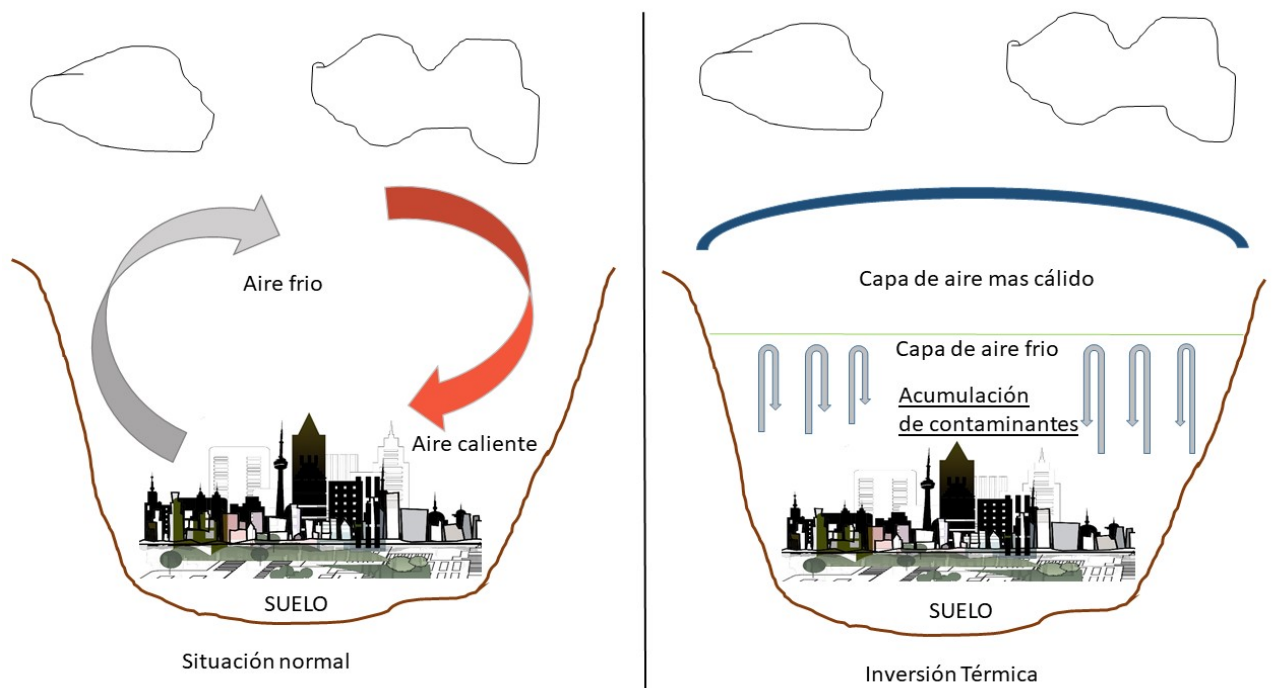


Figura 2. Esquema de inversión térmica.

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.

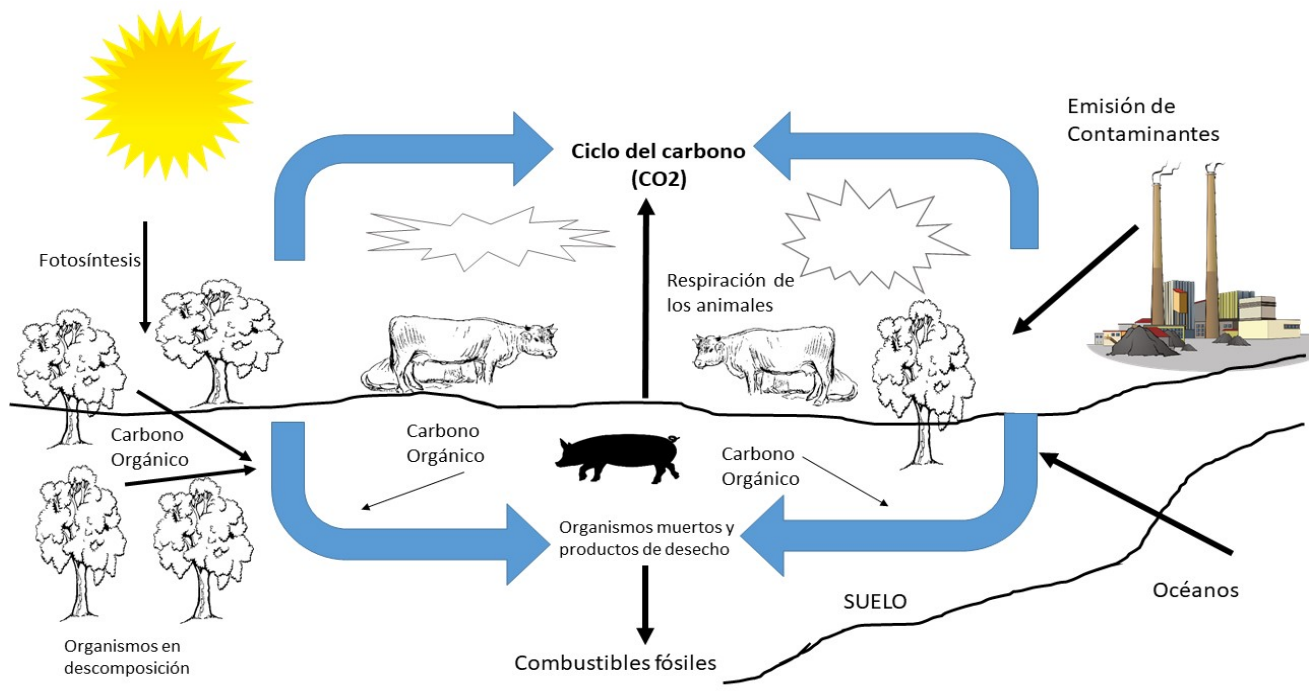


Figura 3. Ciclo del Carbono.

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. Imagen creada por Dann8977 bajo licencia CC BY-SA 4.0.

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 antropogénicas 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 (N_2O), el óxido nítrico (NO), y el dióxido de nitrógeno (NO_2). La principal fuente antropogénica de óxidos de nitrógeno son los procesos de combustión, produciéndose siempre en menor cantidad el NO_2 que el resto de óxidos de nitrógeno (menos del 10%).

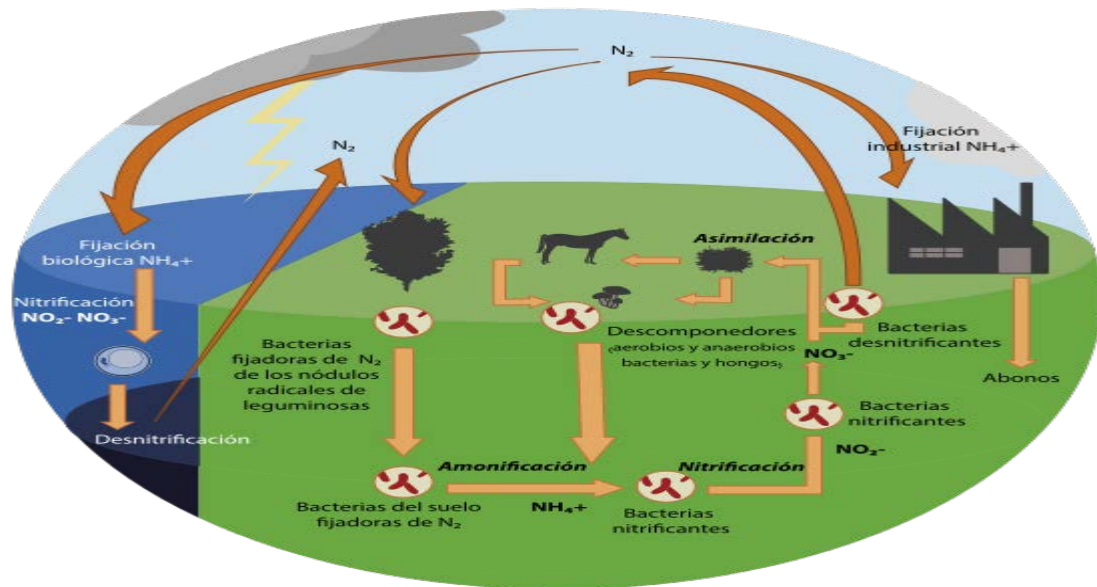


Figura 5. Esquema ciclo del nitrógeno.

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 NO . 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).

hidrogeno (H_2S) que es oxidado hasta SO_2 . Los aportes antropogénicos se generan principalmente a través de la combustión de compuestos azufrados. Siempre se forma SO_2 en gran proporción y en menor proporción SO_3 (1-10%), lo cual es importante debido a la mayor peligrosidad del SO_3 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 SO_2 a SO_3 , incrementándose la peligrosidad de la mezcla sobre los seres vivos expuestos.

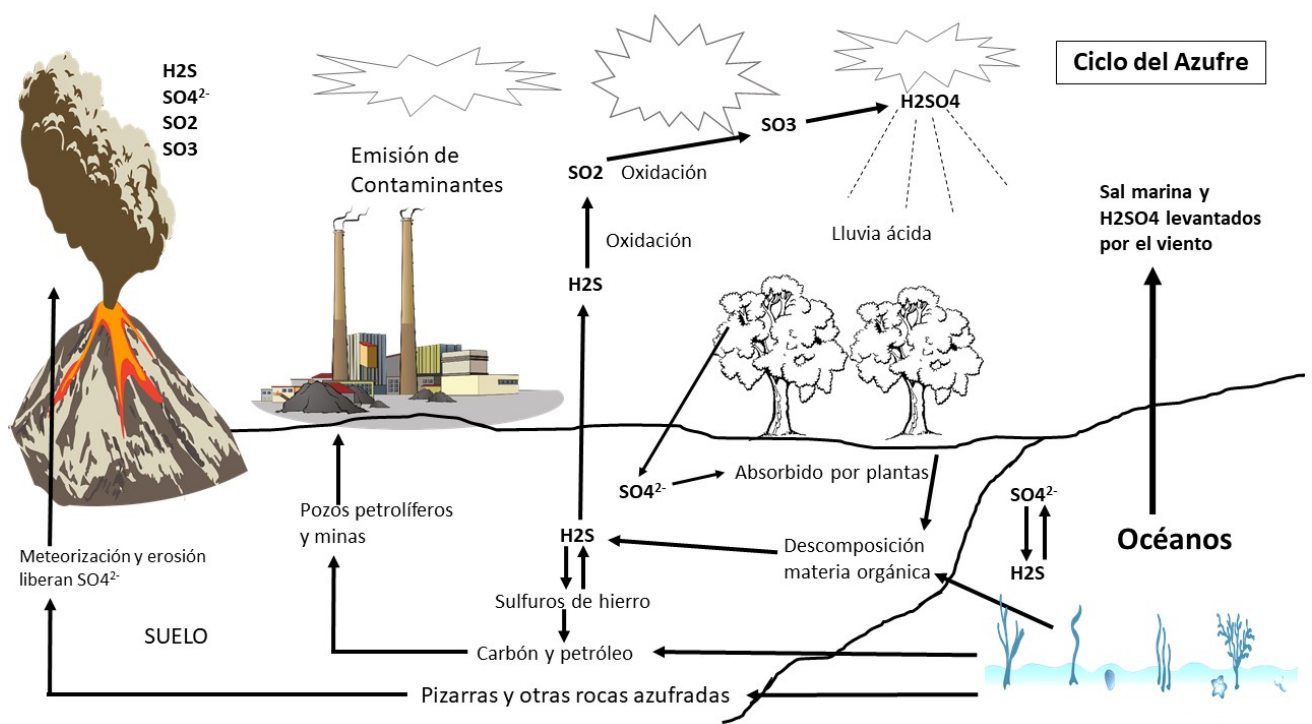


Figura 7. Esquema del ciclo del azufre.

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 perdidos 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 existía 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 ocasiono 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.

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 es 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.

2.2. 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:

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

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

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

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

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

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

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:

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

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.

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

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).

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

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.

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

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

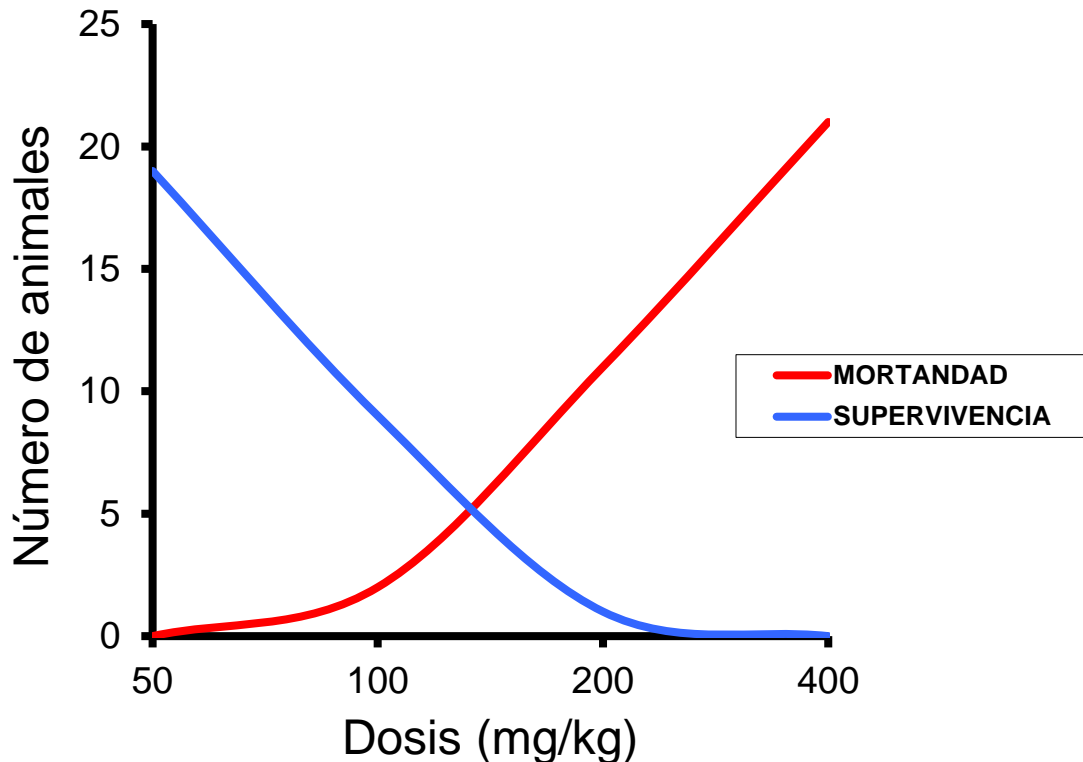
Como el valor que nos interesa es la dosis letal 50, no su logaritmo, en último lugar buscamos el antilogaritmo del número resultante y nos dará la DL_{50} .

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

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} .

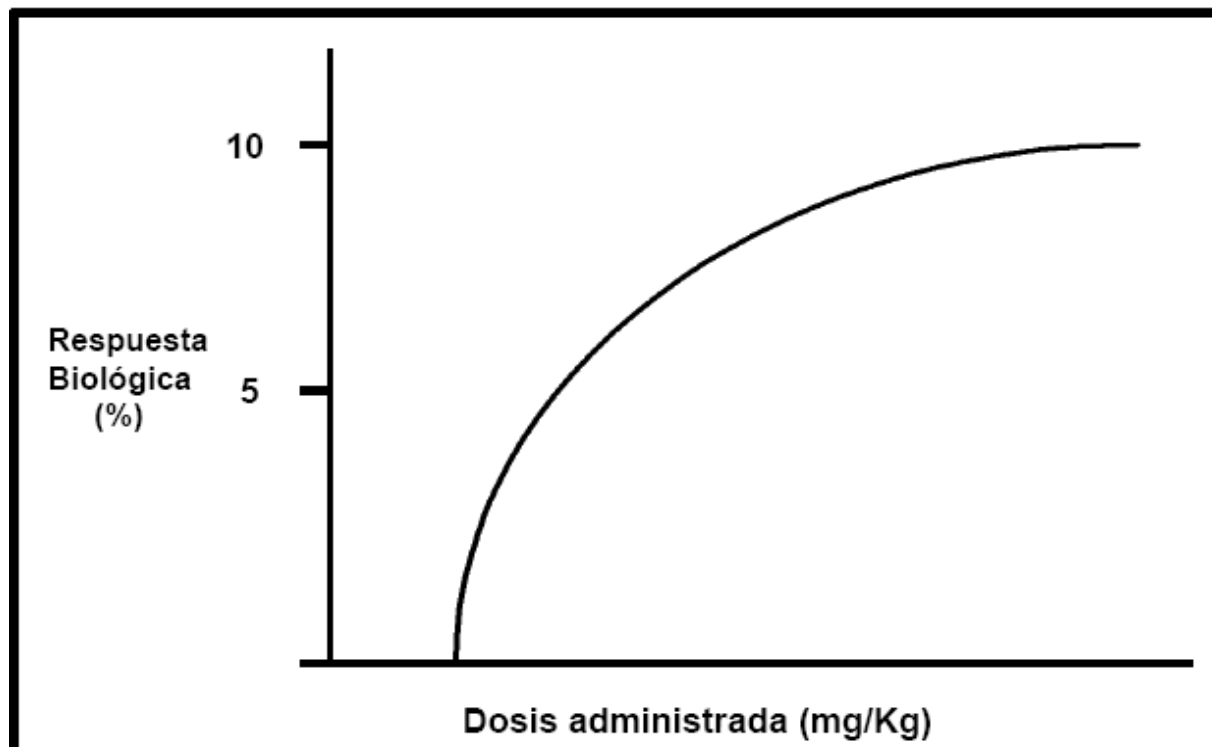


MÉTODO DE MILLER Y TAINTER

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

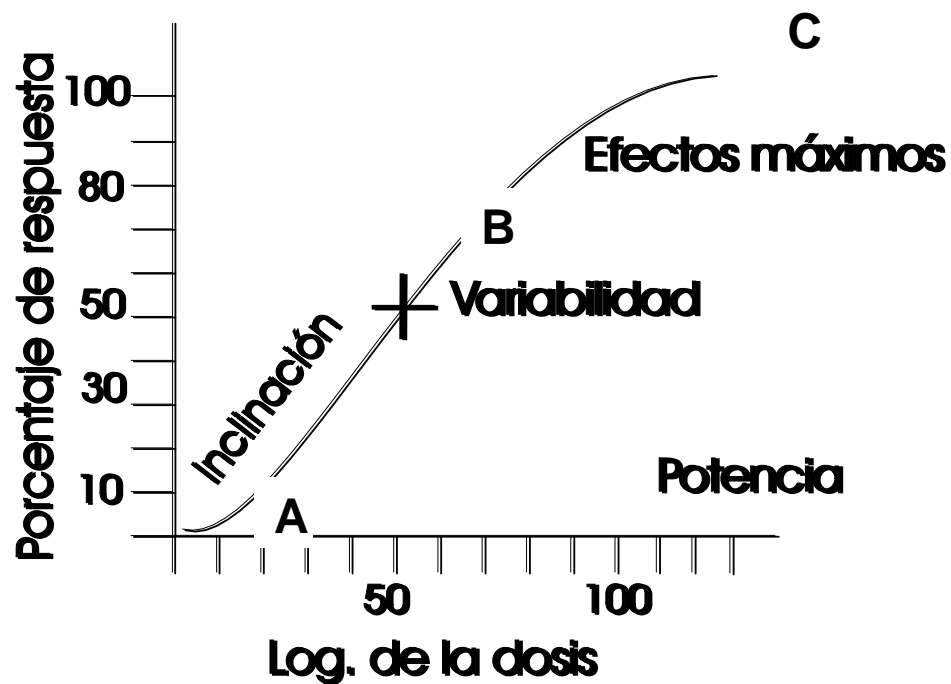
dosis, y así obtenían una curva análoga a la de la curva de Gauss; esta curva tiene forma sigmoidea asimétrica.



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 abcisas logaritmos de dosis en vez de dosis.

CURVA DOSIS RESPUESTA

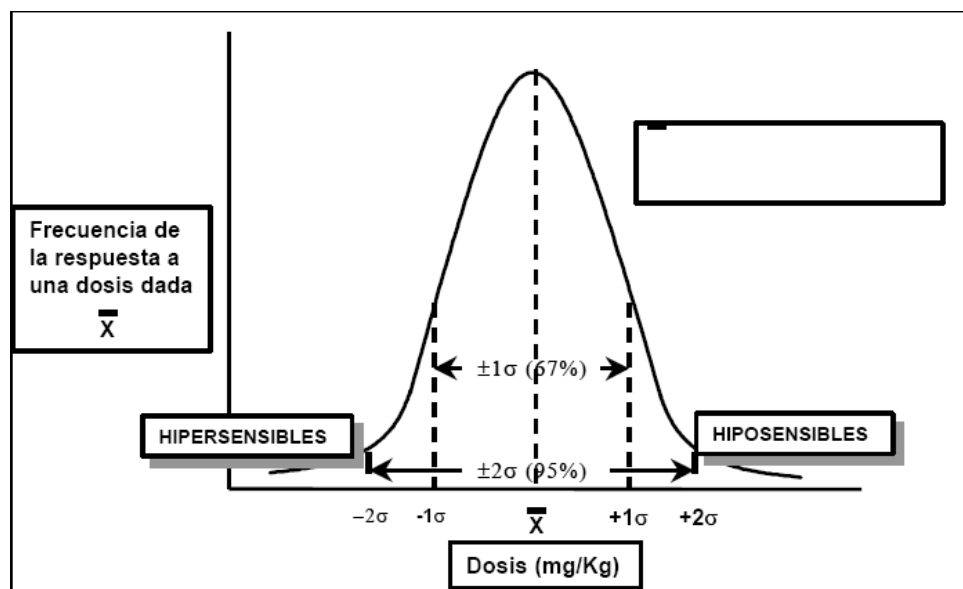


Traven (1927) estableció este tipo de curvas de “porcentajes de mortalidad” o “porcentajes de respuesta”. Se observa en la figura que con una dosis inferior a A no muere ningún animal. La dosis A representa la Dosis Letal Mínima (DL_{01}). La dosis B, a la que mueren el 50% de los animales, es la DL_{50} 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.



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

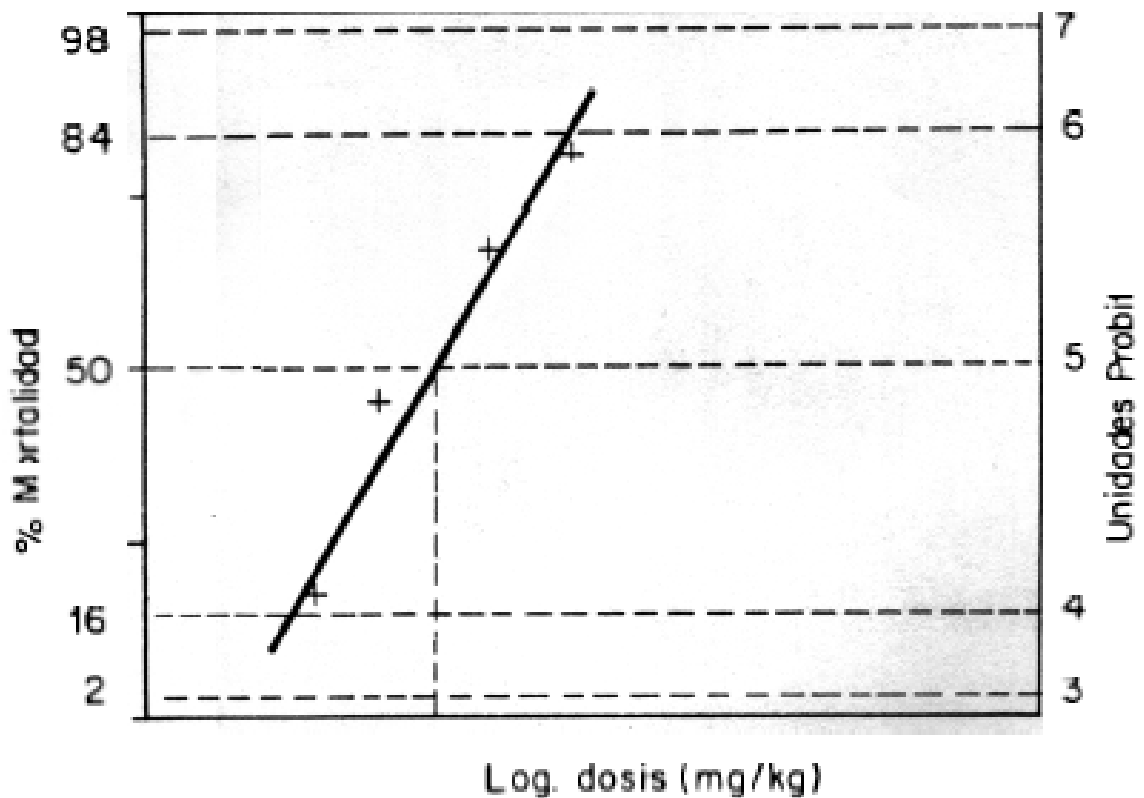
Los Probit son unidades de probabilidad. Se define el probit como la unidad de respuesta obtenida por la adición de 5 unidades a cada uno de los valores de la desviación equivalente normal, obtenida esta a su vez del porcentaje de respuesta obtenido, de tal forma que a un 50% de respuesta se le asigna 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 (disponible en las cuestiones).

Las ventajas de esta medio son varias:

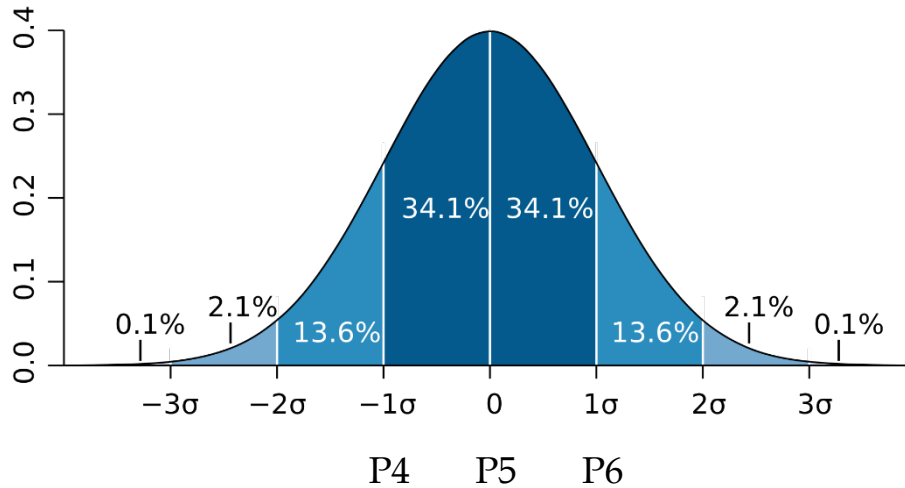
- Para determinar la DL_{50} utilizando el método de Miller y Tainter el número de animales utilizados en el estudio es mucho menor, ya que solo con 3 puntos podemos determinar una recta.
- Podemos calcular fácilmente la pendiente de la recta. Cuanto mayor es la dispersión de los resultados en función 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%).



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).



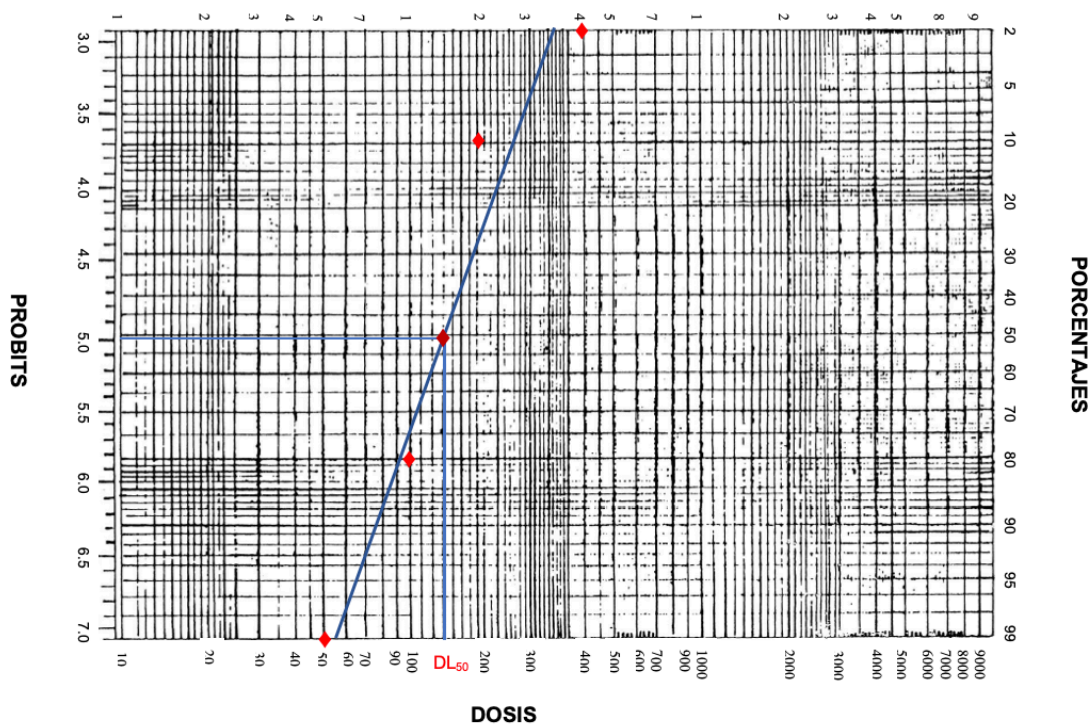
En nuestro caso la media poblacional correspondería al valor del P5 y para calcular el valor de la desviación estándar tendríamos que determinar dos tipos de desviaciones, una a la derecha y otra a la izquierda que corresponderían con los valores obtenidos de P6 (84%) y P4 (16%). Restando el menor (Probit 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

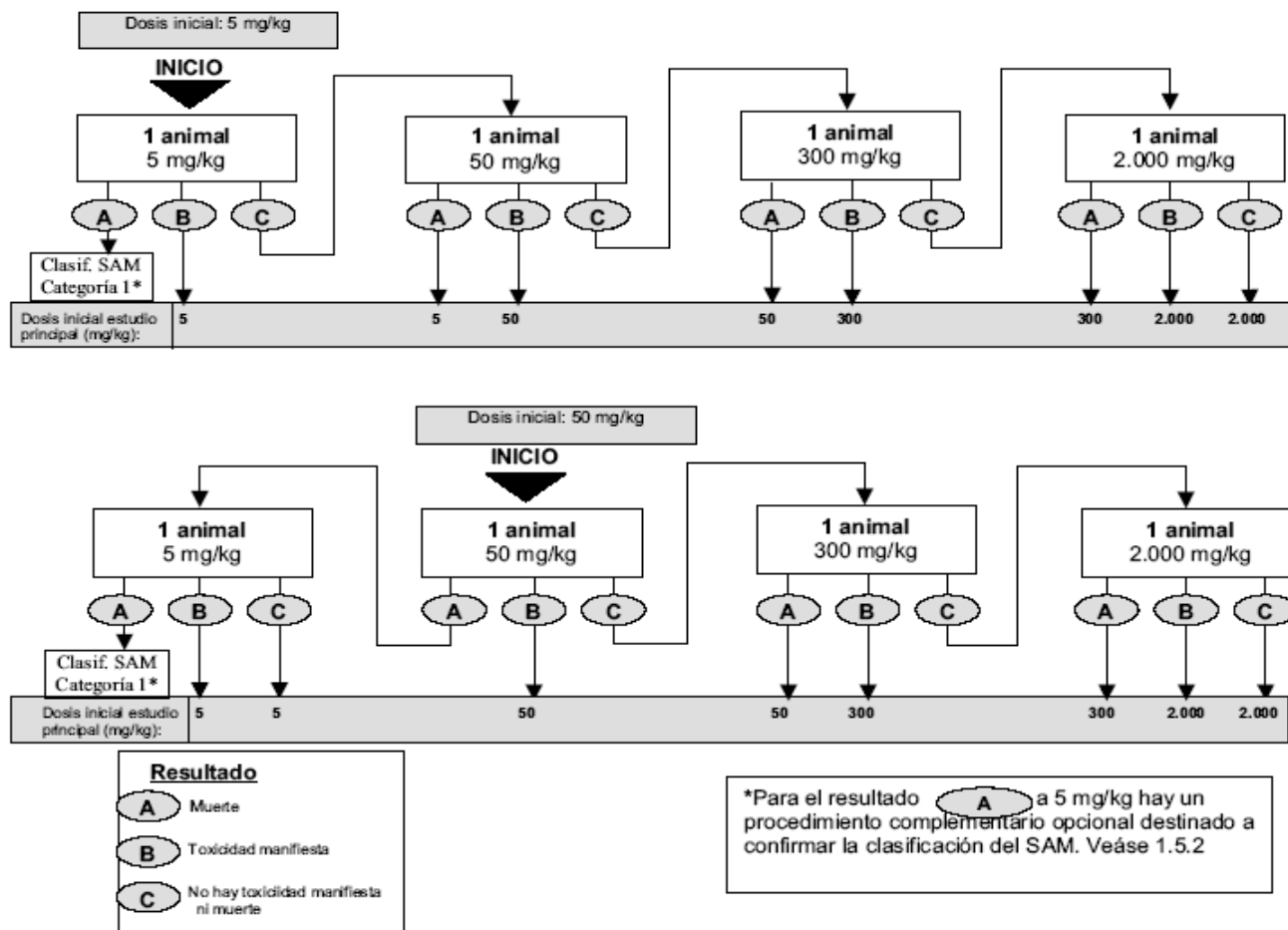
Dosis capaz de originar la muerte de un 100% de los animales = 400 mg/kg p.c.

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

MÉTODO DE DOSIS FIJA

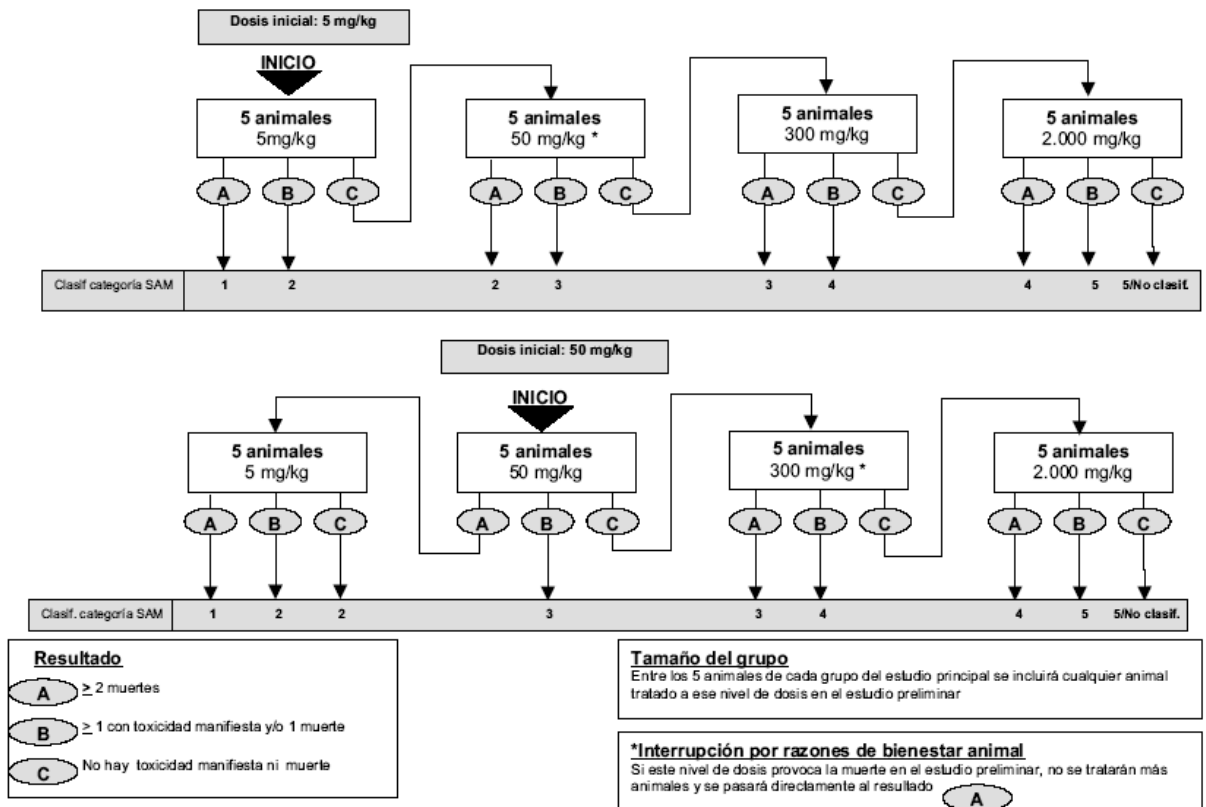
El método de dosis fija se lleva a cabo en ratas en dos fases: En la primera se realiza un estudio preliminar, investigando de manera secuencial los efectos de varias dosis administradas por vía oral a ratas de un solo sexo (machos o hembras). El estudio preliminar proporciona información acerca de la relación entre dosis y toxicidad, así como una estimación de la dosis letal mínima (DL_{01}). No suelen utilizarse más de 1 animal por dosis en esta primera fase.

ANEXO 1: DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRELIMINAR



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-establecidos (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:

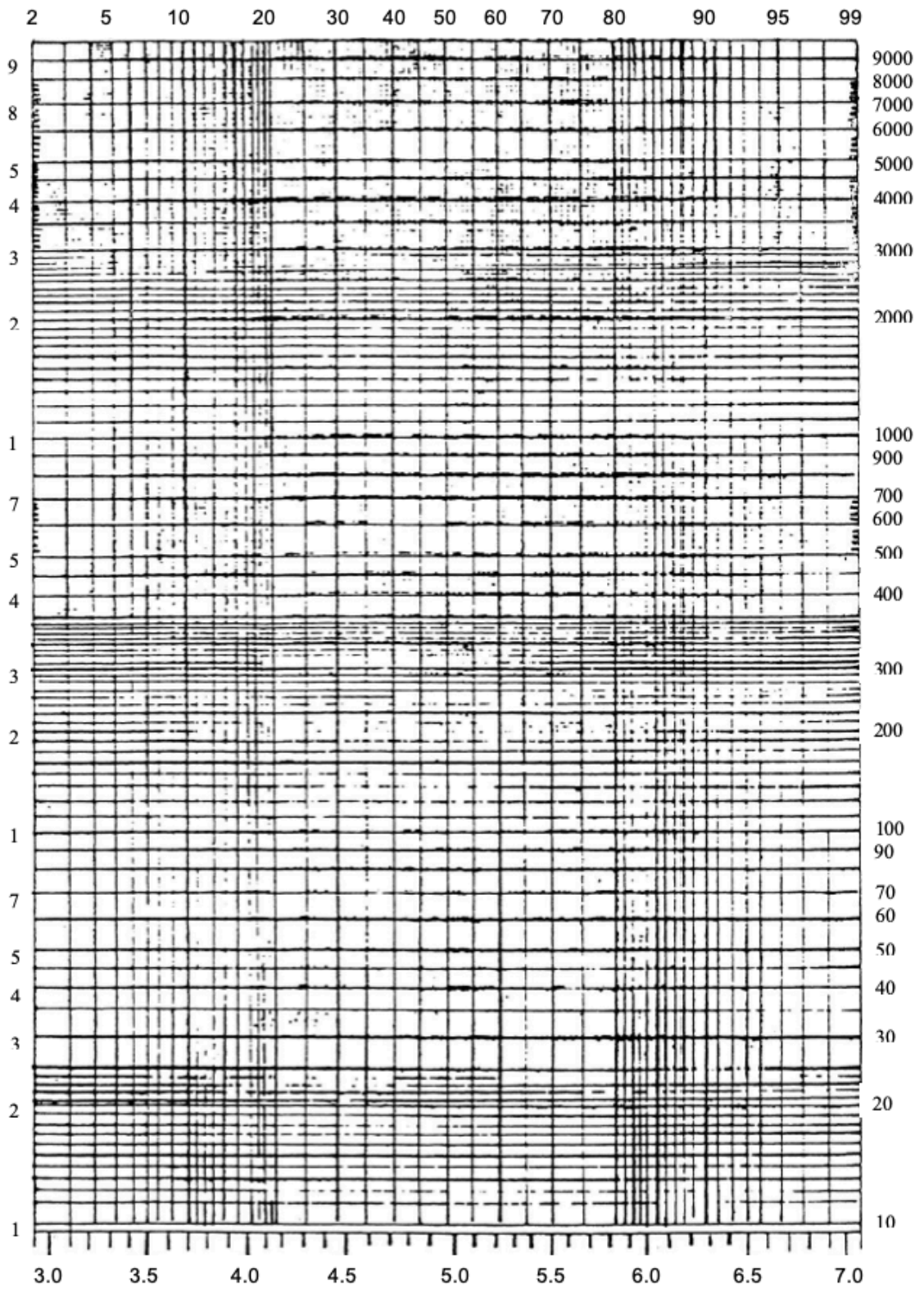
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. (Solamente del ANEXO II. Requisitos relativos a los establecimientos y al alojamiento y al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

PORCENTAJES



2.3. Fuentes de Información en Toxicología. Bases de Datos.

Con el surgimiento de Internet se ha facilitado el acceso gratuito a la información para toda la población. Sin embargo, no toda la información presente en la red es veraz y objetiva por lo que hay que es necesario saber discernir qué información lo es de la que no lo es. Para ello es necesario recurrir a páginas oficiales de organismos internacionales que publican en sus webs información contrastada y revisada por pares. En este sentido, los estudiantes de toxicología y toxicólogos deben de poder distinguir entre los diferentes tipos de fuentes de información toxicológica, su localización, interpretación y manejo dentro de las áreas toxicológicas (reguladora, ocupacional, industrial, clínica, experimental, ambiental, etc).

Para facilitar el aprendizaje y acceso a la información toxicológica varios Profesores del Área de Toxicología de la Universidad de Sevilla y del Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla (Repetto G, Moreno IM, del Peso A, Repetto M, Cameán AM) desarrollaron una herramienta web denominada "BUSCATOX" en el cual se agrupan las principales webs relacionadas con la toxicología en sus diferentes ámbitos permitiendo una búsqueda ágil y sencilla de la información toxicológica en diversas páginas que ofrecen dicha información veraz de forma gratuita.

En dicha web existe un menú con diferentes subapartados en los que podemos encontrar la información toxicológica en los diferentes ámbitos. Así encontramos un apartado de Datos toxicológicos donde se localizan webs que proporcionan información toxicológica general, como por ejemplo Inchem que publican monografías de los compuestos tóxicos estudiados o como la web Pubchem que es una base de datos gestionada por la Biblioteca Nacional de Medicina norteamericana que proporciona información sobre estructuras químicas, identificadores, propiedades químicas y físicas, actividades biológicas, patentes, salud, seguridad, datos de toxicidad entre otros.

Otro apartado es el de publicaciones donde se encuentra el principal buscador a nivel mundial que es PubMed que es una base de datos gestionada por la Biblioteca Nacional de Medicina norteamericana que publica los trabajos científicos publicados en las revistas científicas. Dicha información es una información muy específica que necesita de uso de palabras clave para localizar exactamente aquello que se está buscando y el uso de comandos de inclusión o exclusión.

También podemos encontrar un apartado de Seguridad química y Ocupacional. Aquí podemos encontrar las Fichas Internacionales de Seguridad Química (FISQ) que recogen información esencial de seguridad y salud de sustancias químicas contrastada por un grupo de trabajo a nivel internacional. También podemos encontrar la web del Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el trabajo que publica los Valores Límites de Exposición (VLAs) de exposición laboral por debajo de los cuales los trabajadores están protegidos durante la jornada laboral aunque se produzca una exposición durante todos los años de trabajo. Además hay otras web internacionales que también publican sus valores límites entre otras.

Otro subapartado es Genotoxicidad y Carcinogenicidad donde se presenta el enlace a Webs que presentan información específica en este ámbito como la de la Agencia Internacional Para la Evaluación del Cáncer (IARC) que publica monografías de los estudios realizados sobre distintas sustancias y clasifica las sustancias según los estudios realizados en carcinógenos para el hombre o su probabilidad de que así lo sean.

Tenemos otros subapartados como Medicamentos donde se ubican las principales webs relacionadas con la información Fármacos como por ejemplo la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), Agencia Europea del Medicamento (EMA) o la Agencia Americana de alimentos y medicamentos (FDA). También contamos con otros subapartados como Alimentos, donde se agrupan las principales páginas que recogen información relacionada con la seguridad de los alimentos como el Codex Alimentarius, el Comité

3) ¿Cómo están clasificadas las siguientes sustancias por IARC y cuáles son sus principales órganos diana para aquellos clasificados como 1?

SUSTANCIA	CLASIFICACIÓN IARC	ÓRGANO/S DIANA
ARSÉNICO		
ACRILAMIDA		
METILEUGENOL		
CAFEÍNA		

4) ¿Dónde se puede encontrar información sobre el valor LMR del plaguicida Clorpirifos en productos agrícolas de la Unión Europea? Que niveles son más restrictivos, ¿en mandarinas o manzanas? y del más restrictivo, ¿cuál ha sido su evolución?

5) ¿Dónde podemos encontrar las directrices sobre las opciones para la gestión de riesgos en relación a los resultados de la evaluación de riesgos?

6) Que cantidad de hormonas puede contener la carne destinada a consumo humano en la UE? ¿Qué Directiva lo refleja?

2.4. Toma de muestras. Normas para la recogida, preparación y remisión de muestras para la investigación químico-toxicológica.

Cuando se produce un efecto tóxico es necesario conocer con exactitud el agente causal del mismo. Para ello se deben de tomar muestras allá donde más probable se pueda encontrar dicho agente para poder aislarlo de la matriz en la que se encuentre, identificarlo y por último si es posible cuantificarlo para así poder determinar el grado del efecto tóxico que podemos esperar.

En función de donde se encuentre actuando el tóxico tendremos que tomar un tipo de muestra u otra así en un animal o persona intoxicada o fallecida tendremos que tomar diversas muestras biológicas.

Si nos encontramos ante un vertido en un río tendremos que tomar muestras de agua. Si nos encontramos con una emisión de contaminantes por parte de una industria tendremos que tomar muestras de gases atmosféricos y así según donde se encuentre el tóxico. Por lo tanto según el tipo de muestra, tendrá un tratamiento, preparación, acondicionamiento y remisión al laboratorio.

LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS

La validez de los resultados depende de:

➤ **Perfección del muestreo**

La muestra debe ser representativa del conjunto del que es tomada, cuando el muestreo no se realiza adecuadamente no podemos extrapolar los resultados obtenidos en los análisis practicados sobre dicha muestra.

➤ **Condiciones de la remisión de muestras**

Si la muestra no se procesa adecuadamente para evitar que pueda ser contaminada o que pueda degradarse, los resultados obtenidos sobre la misma no serán representativos de la situación original.

➤ Condiciones de almacenaje

El almacenamiento es fundamental porque hay que evitar que las condiciones del mismo no puedan desencadenar en una degradación de la muestra o del tóxico que la contiene y al final no podamos detectarlo o se haga en una concentración no representativa de la que se encuentra en el conjunto del que es tomada la muestra.

PRECAUCIONES DURANTE LA RECOGIDA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

- Protección del personal que recoge la muestra.
 - Prevenir el contacto directo con la muestra (guantes, mascarilla, bata u otro tipo de ropa protectora).
 - Prohibir el consumo de comidas y bebidas, así como de tabaco.
 - Extremar las condiciones de asepsia y siempre que sea posible utilizar material desechable.
 - Recomendar la vacunación al personal que está en contacto directo con las muestras.

- Protección de la Muestra
 - Contaminación por material biológico humano.
 - Contaminación química
 - Contaminación microbiológica

ORIENTACIÓN HACIA EL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

El iniciar un análisis toxicológico sobre una muestra sin ningún tipo de información es bastante complicado. En el caso de que no se dispusiera de ningún tipo de información se debería de realizar una marcha analítica para ir descartando compuestos por propiedades fisicoquímicas y familias de compuestos, lo cual sería un proceso caro y tedioso. Para evitarlo se necesita proporcionar la mayor información posible para poder orientar dentro de cuáles son los tóxicos más probables que estemos buscando y planificar lo análisis necesarios sobre las muestras para poder aislarlo, identificarlos y cuantificarlos si es que están presentes.

En los casos de las intoxicaciones es necesario aporta diversos datos como son:

- Historia clínica y examen físico del paciente.
- Información acerca de:
 - Agente sospechoso
 - Dosis sospechosa
 - Tiempo entre la ingesta y la toma de muestras
 - Ubicación del paciente/cadáver

En otros casos será necesario mandar la información necesaria para poder llegar a poder acotar los posibles tóxicos. Por ejemplo, si tenemos un vertido en un rio será necesario indicar donde se ha tomado las muestras y las industrias próximas con las actividades que realizan, además de indicar otros factores como olores si es que se perciben de forma específica, aspecto de las aguas documentado con fotografías, etc.

PRINCIPALES MUESTRAS BIOLÓGICAS

La elección de la muestra para el análisis toxicológico hace dependiendo de la sospecha que se tiene, de las propiedades químicas y tipo del producto que se sospecha, de la vía de intoxicación y de los métodos analíticos entre otros factores.

Las principales muestras biológicas que podemos tomar son:

- **Contenido gástrico:**

Se toma muestras de contenido gástrico cuando sospechamos o sabemos que la intoxicación se ha producido por vía oral y ha pasado poco tiempo desde la ingestión del tóxico. La muestra se puede tomar en un vómito espontáneo o inducido tras haberle administrado algún fármaco emético. También se puede hacer sobre el suero empleado para el lavado gástrico. El que no detectemos el tóxico en el contenido gástrico no significa que no se encuentre, sino que puede haberse absorbido por completo antes de que obtuviéramos la muestra.

- **Aspectos positivos:** el tóxico está en alta concentración y es de extracción fácil.
- **Aspectos negativos:** la muestra no es representativa del grado de intoxicación.

- **Orina:**

Se toman muestras de orina cuando el tóxico se elimina si se metaboliza principalmente por esta vía y es difícil de identificarse en otros tejidos. Los tóxicos se concentran en la orina por lo que si las concentraciones presentes en otros tejidos son muy bajas y las técnicas analíticas son poco sensibles esta sería la muestra de elección. Al tomarse la muestra se recomienda no añadir conservantes, o usar fluoruro sódico o azida sódica si se van a tardar en analizar.

- **Aspectos positivos:** Es una muestra no invasiva, la extracción es fácil y exenta de proteínas por lo que las interferencias son mínimas.

- Aspectos negativos: muchos tóxicos se eliminan como metabolitos que son comunes y no podemos diferenciar el tóxico o si la intoxicación cursa de forma aguda y no da tiempo a detectar el mismo.

- **Sangre:**

- Es representativa del grado de intoxicación por lo que es la muestra predilecta.
- Los tóxicos orgánicos básicos alcanzan concentraciones bajas dado que el pH de la sangre es ligeramente básico.
- Se utiliza para el screening de tóxicos ácidos y neutros y para el estudio de gases y sustancias volátiles
- Se recoge en un lugar donde la sangre fluya libremente (para evitar la contaminación hística), y se evita recogerla de cavidades abiertas ya que se puede haber contaminado (teniendo un efecto de concentración o dilución, según los casos).
- Los tóxicos se pueden encontrar en la sangre unidos a los eritrocitos, disueltos en la sangre o unidos a proteínas plasmáticas: por esa razón hay que elegir entre analizar sangre total o plasma. El plasma tiene menos interferencias que la sangre total. Se evita la formación de emulsiones con los disolventes orgánicos como sucede en sangre total.
- Se suelen añadir anticoagulantes excepto para la determinación del plomo por espectrometría de absorción atómica, y conservantes cloruro sódico (para evitar que interfieran en el análisis y den falsos positivos).
- Las muestras de sangre post-mortem se deben agitar vigorosamente e incluso someter a ultrasonidos para fluidificarlas.

- **Pelo:**

- Se usa en casos de intoxicación por drogas o metales pesados.
- Resisten a la degradación y es factible someterlo a análisis.
- La recolección de pelo es simple, no invasiva y replicable en caso de una eventual confirmación.
- La muestra no puede ser alterada físicamente, ni puede ser manipulada las concentraciones de drogas (por ingesta de

algún agente neutralizante, como podría ocurrir en el caso de sangre) o metales encontradas en la muestra.

- Para las drogas, el pelo provee una ventana más amplia de detección que muestras como orina y sangre (del orden de varias semanas a meses) en las cuales las drogas permanecen durante un corto periodo.

- **Humor vítreo:**

- Es de accesibilidad fácil y con un volumen suficiente para poder realizar el análisis.
- El aislamiento de los tóxicos es fácil ya que contiene pocas proteínas y enzimas.
- Es resistente a la contaminación bacteriana y tarda en degradarse.

- **Hígado:**

- Muchos tóxicos son degradados a nivel hepático siendo posible encontrarlo en este tejido fácilmente.
- Tarda mucho más tiempo que otros tejidos en degradarse por lo que es una muestra de lección post-mortem
- Hay que tener cuidado en su extracción por que puede ser contaminado con la bilis.

- **Otros tejidos:**

- Cerebro: intoxicaciones con disolventes y alcohol.
- Riñón: intoxicaciones por metales
- Bilis: sobredosis de opiáceos
- Pelo: tóxicos minerales

NORMAS PARA LA TRAMITACIÓN, PREPARACIÓN Y ENVIO DE MUESTRAS

Hay que tener en cuenta a la hora de realizar el procesado de las muestras y su envío si son tomadas para un proceso judicial en cuyo caso deben de seguir lo indicado en la Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación

y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF).

El INTCF es un órgano técnico adscrito al ministerio de Justicia con tres Departamentos del Instituto (Madrid, Sevilla y Barcelona), cuya misión, entre otras, es la realizar todos los análisis pertinentes en materia de toxicología así como la de realizar los informes y asesorar en dicha materia a la administración de justicia.

Para poder enviar las muestras al INTCF se debe de rellenar los formularios correspondientes en función del tipo de muestra y análisis a realizar que se encuentran como anexos de la Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo. Antes de enviar las muestras se le debe de comunicar al laboratorio el envío y se debe de enviar los datos de las muestras así como los datos necesarios para realizar la investigación.

En los procesos judiciales es necesario que se mantenga la cadena de custodia en todo momento. La cadena de custodia supone saber que ha pasado con la muestra en todo momento y quien la ha manipulado, de tal manera que no existe ninguna duda sobre los resultados obtenidos en las muestras y que no ha podido ser manipulados. Cuando se rompe la cadena de custodia las muestras y resultados obtenidos quedan invalidados.

Para mantener la cadena de custodia cada muestra debe llevar la siguiente información:

- La toma de muestras se ha practicado en el día...
- Las muestras han sido envasadas y etiquetadas por...
- Tipo y/o número de precinto....
- Fecha de remisión de muestras al laboratorio....
- Condiciones de almacenaje hasta su envío....
- Transporte efectuado por....
- Firmado por....

Embalaje

- **Interior**

- Primario: envase de plástico, de rosca, cerrando de forma. Si la muestra es corrosiva o puede quedar adsorbida en las paredes del plástico, no se toma en este material, sino que se toma en vidrio. Cada muestra debe enviarse precintada, cerrada, con número de referencia, con fecha y hora de recogida, nombre o identificación y firma de la persona que recoge la muestra, especificando lo que contienen y el paciente al que pertenecen.
- Secundario: saco de plástico con cierre hermético. Debe llevar material absorbente por si se produce un derrame.

- **Exterior**

- Se emplea una nevera. Siempre asumimos que necesitan refrigeración. Algo muy importante es solo poner muestra de 1 individuo por nevera, para que no se mezclen las muestras. Deben llevar etiquetas que lo identifiquen
- Se produce la refrigeración (alrededor del embalaje secundario). El embalaje puede ser hermético con refrigeración con frigolines o con salida de CO₂ y refrigeración por hielo seco.
- En el exterior se deben de pegar las etiquetas que deben identificar el tipo de sustancia que contiene el envío y las características de manejo siendo de materiales perdurables, legibles y visibles.

Recepción de muestras en el laboratorio

Una vez que se reciben las muestras en el laboratorio se debe de mantener la cadena de custodia para ello se deben de seguir los siguientes pasos:

1. Recibir las muestras y rellenar la hoja de custodia anotando:
 - Nombre de la persona que entrega la muestra
 - Nombre de la persona que recibe la muestra

- Fecha y hora de entrega
- Empresa que realiza el transporte (si procede)
- 2. Comprobar el número de referencia de cada muestra y compararlo con el formulario enviado
 - Anotar discrepancias, si existen
- 3. Comprobar que todas las muestras estén bien empaquetadas y que los precintos estén íntegros
 - Anotar discrepancias, si existen
- 4. Al abrir los recipientes, bolsas, etc. que contienen las muestras comprobar que la identificación y descripción son correctas
- 5. Fotografiar las muestras y anotar su estado de conservación

Almacenamiento de las muestras

Si las muestras no pueden ser procesadas en el momento de entrega, que es lo más habitual, es necesario realizar un almacenamiento adecuado de las mismas para evitar que estas se puedan descomponer.

Los principales factores que pueden producir descomposición química y biológica son:

- o Luz: Muchos compuestos químicos son fotolábiles, es decir, la luz los degrada. Esta asunción hay que asumirla siempre, tratando de que las muestras no estén expuestas a la luz. Por lo tanto, hay que utilizar frascos no transparentes de color topacio o envueltos con papel de aluminio fundamentalmente en muestras de fluidos biológicos transparentes como la orina. Los alcaloides del cornezuelo de centeno y las fenotiacinas son fotolábiles.
- o Hidrolisis: Los tóxicos tipos éster como los anestésicos locales son hidrolizados a temperatura ambiente e incluso a temperaturas bajas por la acción de esterases de sangre y tejidos. El pH alcalino favorece la hidrólisis. Para evitarlos se añaden inhibidores de esterases como fluoruro sódico o acidificar las muestras hasta pH 4.

- Temperatura: 4°C para la conservación y -20°C para el almacenamiento. Solo se descongela una vez, ya que si no se degrada la muestra. Se dividirá en diferentes fracciones.
- Oxidación: La oxidación se puede prevenir reduciendo al mínimo la cantidad de oxígeno en los recipientes llenándolos al máximo y cerrándolos herméticamente. Se pueden adicionar antioxidantes (aunque esto puede reducir los metabolitos oxidados de algunos tóxicos a sus productos originales). También influye la temperatura y el pH, así tenemos que los compuestos fenólicos se oxidan a 4°C y los que contienen azufre son oxidados en medio alcalino. Los iones metálicos actúan como catalizadores. Su efecto puede disminuirse adicionando una proteína a la que se unan y dejen de actuar (p. ej. seroalbúmina bovina).
- Descomposición biológica: se descomponen componentes de la muestra dando lugar a la formación de otras sustancias nuevas (como el alcohol). Para evitarla y obtener un resultado más fiable, se divide la muestra en dos: una parte sin nada, y la otra con conservantes.

Otro factor que puede alterar la composición de la muestra es la **contaminación**. Consiste en el paso a la muestra de compuestos formados durante la putrefacción o de los componentes de los envases.

- Ejemplo de putrefacción: Aparece fenetilamina y se puede confundir con la metanfetamina. También se produce tiramina y triptófano.
- Ejemplo de contaminación por componentes de los envases: Plastificante tipo ftalatos de los envases o los tapones.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una vez realizado los análisis sobre las muestras, podemos llegar a identificar y cuantificar el tóxico presente en la muestra. Sin embargo,

en muchos de los casos no es posible la detección del toxico en la muestra por diversas causas como pueden ser:

1. Defectos del método analítico
2. Descomposición del toxico durante el almacenamiento
3. Que el toxico se haya eliminado antes de producirse los efectos y recogerse la muestra

En el caso de que podamos identificar y cuantificar el toxico presente, puede ocurrir que los datos obtenidos no sean exactos debido a:

1. Insuficiente soporte estadístico
2. Diferencias intra- e interindividuales
3. Interacciones entre tóxicos
4. Diferencias de sensibilidad y exactitud de las técnicas analíticas empleadas
5. Diferencias entre los valores de concentraciones toxicas en las distintas muestras

PROBLEMAS Y CUESTIONES

1. Se debe de elaborar un caso de práctico de una intoxicación en la que el alumno indique la historia clínica y toda aquella información necesaria para determinar que posible toxico la ha originado, indicar que muestras se han tomado justificadamente, como se han empaquetado y enviado y almacenado. Indicar como se ha mantenido la cadena de custodia paso a paso, y rellenar el formulario específico para enviar al INTCF.

(Descargar los PDF de los formularios del INTCF, apartado de documentación)