

Revista de

# Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 41 Número 2 (2024)

SEMESTRAL

## INDEX

<i>Carreño-Mora, M., García-Muñoz J., Fernández-Casado, D., Portillo Moreno, A., Martínez-Morcillo S., Soler F.I, Míguez-Santiyán M.P., Pérez-López M. Effects of endocrine disruptors on the reproductive system of reptiles: an updated review</i> .....	68
<i>De Pablo Ruiz J, Anadón Baselga MJ Current Alcohol Intake. Technical Report on Retrospective Alcohol Levels. A Two-Case Study</i> .....	74
<i>Peña-Fernández A., Angulo S., González-Muñoz M.J., Peña M. Á. Effect of silicic acid and alcoholic beer intake on the excretion of chromium and vanadium and their deposition in the brains of mice chronically exposed to aluminium nitrate.</i> .....	81
<i>Zertuche Lopez K, Aquino Pérez RA., Calvo Aguilar O. Anticholinergic syndrome in the elderly by Brugmansia arborea applied in traditional medicine: case report</i> .....	85
<i>Cascajosa-Lira A, Prieto A.I., Pichardo S., Guzmán-Guillén R., Jos A., Aguinaga-Casañas M.A., Baños A., Cameán A.M. In vitro and in vivo safety assessment of natural sulfur compounds for their potential use in the agri-food sector: bibliographic review</i> .....	89
<i>Aroni-Ccanri B. M. Curasi-Curasi V. Zolorzano-Aitara R. M. Cardona - Rivero A. Moreyra - Pachas C.A. Knowledge, attitudes and practices regarding pesticides in students from a University in Peru</i> .....	96
<i>Tejedor Tejada E.; Benedí González J.; Moro Aguado J. y Tejedor Muñoz JM.. Assessment of cannabis degradation</i> .....	100
<b>Proceedings Of The Spanish And Ibero-American Toxicology Conference, 2023</b> .....	106
<b>Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2024</b> .....	126

Indexed in Latindex, REDALYC, ÍndICES-CSIC, IBECS

## ÍNDICE

<i>Carreño-Mora, M., García-Muñoz J., Fernández-Casado, D., Portillo Moreno, A., Martínez-Morcillo S., Soler F.I, Míguez-Santiyán M.P., Pérez-López M. Efectos de los disruptores endocrinos sobre el sistema reproductor de los reptiles: una revisión actualizada</i> .....	68
<i>De Pablo Ruiz J, Anadón Baselga MJ Ingesta alcohólica actual. Informe técnico de tasa de alcoholemia retrospectiva. Estudio de dos casos.</i> .....	74
<i>Peña-Fernández A., Angulo S., González-Muñoz M.J., Peña M. Á. Efecto de la ingesta de ácido silícico y cerveza alcohólica sobre la excreción de cromo y vanadio y su depósito en el cerebro de ratones expuestos crónicamente al nitrato de aluminio</i> .....	81
<i>Zertuche Lopez K, Aquino Pérez RA., Calvo Aguilar O. Síndrome anticolinérgico en adulto mayor por Brugmansia arborea aplicada en medicina tradicional: reporte de caso</i> .....	85
<i>Cascajosa-Lira A, Prieto A.I., Pichardo S., Guzmán-Guillén R., Jos A., Aguinaga-Casañas M.A., Baños A., Cameán A.M. Evaluación de la seguridad in vitro e in vivo de compuestos azufrados naturales para su uso potencial en el ámbito agroalimentario: revisión bibliográfica</i> .....	89
<i>Aroni-Ccanri B. M. Curasi-Curasi V. Zolorzano-Aitara R. M. Cardona - Rivero A. Moreyra - Pachas C.A. Conocimiento, actitudes y prácticas sobre plaguicidas en estudiantes de una Universidad del Perú</i> .....	96
<i>Tejedor Tejada E.; Benedí González J.; Moro Aguado J. y Tejedor Muñoz JM.. Evaluación de la degradación del cannabis</i> .....	100
<b>Actas De Las Jornadas De Toxicología Españolas E Iberoamericanas, 2023</b> .....	106
<b>Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2024</b> .....	126

Incluida en Latindex, REDALYC, ÍndICES-CSIC, IBECS



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA  
Rev. Toxicol. 41 (2), 68-136 (2024)  
ISSN 0212-7113

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

Es una revista electrónica diseñada para facilitar la divulgación de la investigación actual en el campo de la Toxicología.

## ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

### Resumen actual de características y normativas

El objetivo fundamental de la Asociación Española de Toxicología es el de propiciar la relación y cooperación entre sus miembros, y coordinar sus esfuerzos a fin de contribuir al desarrollo y difusión de los conocimientos en las diferentes áreas de la toxicología. Su Estatuto fundacional fue aprobado oficialmente el 15 de enero de 1980.

Toda persona interesada en pertenecer a esta Asociación deberá cumplimentar una ficha de inscripción, refrendada por la Junta Directiva. La cuota anual (60 €) se abona por domiciliación bancaria. Esta cuota da derecho a la recepción de la Revista de Toxicología cuando se publique una versión impresa, y a la reducción de la cuota de inscripción en los congresos y jornadas organizados por la asociación. Una vez admitidos los nuevos asociados recibirán un título y, periódicamente, las actas de las reuniones y comunicación de actividades con carácter nacional e internacional que pueden ser de interés.

La asociación promueve la celebración, cada dos años, del Congreso Español de Toxicología, cuya organización puede delegar. Además, se ha establecido la celebración periódica de seminarios o mesas redondas organizadas por grupos de trabajo. Cada reunión de este tipo será monotemática y abierta a personas no pertenecientes a la Asociación, y se desarrollará en diferentes ciudades españolas.

### Asociación Española de Toxicología

Secretaría de la AETOX

Nahúm Ayala Soldado

Dpto. de Anatomía y Anatomía Patológica

Comparadas y Toxicología, Facultad de Veterinaria.

Universidad de Córdoba Tel: 957212019

E-mail: secretaria@aetox.es

### Copyright

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

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

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

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

El Equipo Editorial: [revista@aetox.es](mailto:revista@aetox.es)

### Editora jefe:

Dra. Emilia Ferrer García. Universitat de València.  
Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal.

Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Valencia

### Editora adjunta:

M<sup>a</sup> del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura. Spain.

### Editor asociado:

Dr. Juan Carlos Rios Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile

DL.: C0-723-83.

S.V.: 91051R.

ISSN: 0212-7113

ISSN e: 1697-0748

Revista de

# *Toxicología*

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

## COMITÉ EDITORIAL/EDITORIAL BOARD

### **Editora jefe/Editor In Chief**

Emilia Ferrer García. Universitat de Valencia. Spain.

### **Editora adjunta/Deputy Editor-in-Chief**

M<sup>a</sup> del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura. Spain.

### **Editor Asociado/Associate Editor**

Juan Carlos Ríos Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile.

### **Consejo Editorial/Editorial Committee**

Nahúm Ayala Soldado. Universidad de Córdoba. Spain.

Iván Álvarez Freire. Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro (INCIFOR). Spain.

Ana María Cameán Fernández. Universidad de Sevilla. Spain.

Dionisia Carballo. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.

Mónica Fernández Franzón. Universitat de Valencia. Spain.

David Hernández Moreno. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Spain.

Ángeles Jos Gallego. Universidad de Sevilla. Spain. Emma Martínez López. Universidad de Murcia. Spain.

Ana María Molina López. Universidad de Cordoba. Spain.

Miguel A. Mora. Texas A&M University. Estados Unidos.

Pablo Olmedo Palma. Universidad de Granada. Spain. Marcos Pérez López. Universidad de Extremadura. Spain.

Octavio Luis Pérez Luzardo. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Spain.

Ana Isabel Prieto Ortega. Universidad de Sevilla. Spain. María José Ruiz Leal. Universitat de Valencia. Spain.

Gianni Sagratini. Università degli Studi di Camerino.

Sabina Stranno-Rossi. Università Cattolica Sacro Cuore. Roma. Italia.

Verónica Zingales. Università degli Studi di Padova. Italia.

# Efectos de los disruptores endocrinos sobre el sistema reproductor de los reptiles: una revisión actualizada

Carreño-Mora, M., García-Muñoz J., Fernández-Casado, D., Portillo Moreno, A., Martínez-Morcillo S., Soler F.<sup>1</sup>, Míguez-Santiyán M.P., Pérez-López M.

*Unidad de Toxicología. Facultad de Veterinaria (UEX). Avda de la Universidad s/n. 10003 Cáceres.*

**Resumen:** El vertido de contaminantes sobre océanos, mares, ríos y lagos, así como el uso de sustancias químicas sobre los cultivos, cuyos efectos adversos no han sido estudiados en profundidad, suponen uno de los mayores riesgos para las especies animales que habitan en esos ecosistemas. De hecho, numerosas de estas poblaciones están reduciéndose drásticamente, no solo por los efectos agudos de estos tóxicos sino también por los agentes que ocasionan un descontrol en el sistema endocrino de estos animales. Estos componentes, denominados disruptores endocrinos, son sustancias químicas capaces de alterar el mecanismo hormonal, dando lugar a desequilibrios que pueden ocasionar problemas de tipo reproductivo y de desarrollo principalmente, aunque son capaces de alterar otros sistemas del organismo.

El presente trabajo realiza una revisión de un grupo taxonómico en concreto, los reptiles, ya que son excelentes bioindicadores por algunas de sus características, comentadas en este estudio. En concreto, se revisan 3 géneros, *Alligator* (especie *Alligator mississippiensis*) (aligátor americano), *Trachemys* (especie *Trachemys scripta*) (galápagos de Florida) y *Podarcis* (especie *Podarcis sicula*) (lagartija italiana), englobadas en el grupo de reptiles TSD (Temperature-dependent Sex Determination), en los cuales los efectos de los disruptores endocrinos han sido más estudiados.

**Palabras clave:** Disruptor endocrino, fauna salvaje, reptil, ecotoxicología, hormona, contaminante.

**Abstract:** *Effects of endocrine disruptors on the reproductive system of reptiles: an updated review*

The discharge of pollutants over oceans, seas, rivers and lakes, as well as the use of chemical substances on crops, whose adverse effects have not been studied in depth, represent one of the greatest risks for the animal species that inhabit these ecosystems. In fact, many of these populations are drastically reduced, not only by the acute effects of these toxins but also by the components that cause a lack of control in the endocrine system of these animals. These components, called endocrine disruptors, are chemical substances capable of altering the hormonal mechanism, leading to imbalances that can cause both reproductive and developmental problems, although they are capable of altering other systems of the body.

This work is focused on a review of a specific taxonomic group, reptiles, since their species are excellent bioindicators according to some of their characteristics, that are discussed in this study. More specifically, 3 genera are reviewed, *Alligator* (species *Alligator mississippiensis*) (American alligator), *Trachemys* (species *Trachemys scripta*) (Pond slider) and *Podarcis* (species *Podarcis sicula*) (Italian wall lizard), encompassed in the group of TSD reptiles (Temperature-dependent Sex Determination), in which the effects of endocrine disruptors have been more studied.

**Keywords:** endocrine disruptor, wildlife, reptile, ecotoxicology, hormone, contaminant.

## Introduction

Vivimos en un mundo en el que las moléculas químicas sintetizadas por el ser humano forman parte de nuestro día a día, algunas de las cuales claramente afectan a los procesos de desarrollo de los seres humanos y de toda la fauna del planeta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), algunas de estas moléculas, conocidas como disruptores endocrinos (EDCs, acrónimo mundialmente

reconocido a partir de su forma anglosajona, *Endocrine Disruptor Compounds*), alteran la función del sistema endocrino y, en consecuencia, ocasionan efectos adversos en un organismo sano o en su descendencia (WHO, 2013). Los EDCs incluyen compuestos con importantes usos agrícolas, industriales y farmacéuticos, que pueden convertirse en problemas de contaminación a través de la exposición inadvertida de los seres humanos o la vida silvestre a ellos, a muy variadas concentraciones. Muchos tipos diferentes de productos químicos poseen las características necesarias para ser clasificados como EDCs y, más allá de sus efectos en el sistema endocrino, no hay una característica o propiedad única que todos compartan (Godfray et al., 2019).

Desde que en la década de los años 50 se descubrió que un compuesto químico usado como insecticida, el DDT (diclorodifeniltricloroetano), imitaba el comportamiento de los estrógenos en el organismo, se han hallado multitud de compuestos químicos que se pueden clasificar en el mismo grupo, los denominados estrógeno-miméticos (Burlington y Lindeman, 1950). De hecho, desde entonces, se han evidenciado claramente los efectos negativos derivados del uso de muchas de estas sustancias en el medio ambiente. En la actualidad, el exhaustivo trabajo de investigadores y agencias responsables ha propiciado que el listado de sustancias clasificadas como potenciales EDCs crezca de forma preocupante, y muchas sustancias de las que no se tenía constancia que tuvieran esta actuación como alteradores endocrinos han pasado a ser clasificadas como tales, cuantificándose a niveles elevados en el medio ambiente (WHO, 2013).

Dentro de la fauna salvaje, en el grupo de los reptiles se ha podido constatar un declive brusco y generalizado de todas sus especies a nivel mundial, ya que son cada vez más las que se incluyen en el listado de especies amenazadas o en peligro de extinción, llegando a constatar que el 28% de las especies de reptiles analizadas se encontraban amenazadas, eran vulnerables o estaban en peligro de extinción (Grillitsch y Schiesari, 2000). Este declive puede suponer el cambio irreversible de un ecosistema, al romperse la cadena trófica que lo sustenta, ya que muchos reptiles son predadores de insectos y pequeños roedores, ejerciendo una acción reguladora sobre estas especies, mientras que también sirven de alimento a especies depredadoras. Las consecuencias serán, pues, imprevisibles (IUCN, 2010).

En este punto conviene recordar que, en general, los reptiles son los grandes olvidados de los estudios de Ecotoxicología, ya que menos del 1% de los estudios se centra en este grupo taxonómico (Hopkins, 2010). Además, este tipo de estudios se realizan sobre todo en especies de vida eminentemente acuática, ya que este medio actúa como una "sopa" en la que se distribuyen más uniformemente los posibles agentes tóxicos, siendo por tanto más sencillo investigar en ella todas sus características ambientales. Sin embargo, otras especies de vida eminentemente terrestre suelen quedar más relegadas en estos trabajos. Concretamente, los estudios consultados se centran principalmente en 3 géneros (mostrados en la imagen 1), por sus especiales particularidades:

- *Alligator*: buenos bioindicadores del estado de las aguas (por ejemplo, se han empleado en muchos estudios en EE.UU.), además de que, al encontrarse en lo más alto de la cadena alimentaria (solo por debajo de los humanos), se comportan como bioacumuladores de sustancias tóxicas. Además, tanto su longevidad y su alta tasa de reproducción hacen que sean buenos ejemplares de estudio

\*e-mail: marcospl@unex.es



**Imagen 1.** De izquierda a derecha, ejemplar de *Alligator mississippiensis*, *Trachemys scripta* y *Podarcis sicula* (Fuente: CreativeCommons©).

- (Manolis et al., 2001). Su especie más representativa es *Alligator mississippiensis*.
- *Trachemys*: viven en ambientes acuáticos y su alimentación se basa en peces. Debido a su longevidad (esperanza de vida de 30 años o incluso más) y su gran capacidad de adaptación a cualquier ecosistema, son buenos objetos de estudio (Eisenreich et al., 2012). Su especie más representativa es *Trachemys scripta*.
- *Podarcis*: uno de los grupos de reptiles más comunes, con una alta tasa de reproducción, y una alimentación basada en insectos (que acumulan pesticidas, algunos de ellos conocidos EDCs). Al estar en altas densidades en los ecosistemas, son especies idónea para el estudio (Sciarrillo et al., 2008), siendo la más representativa *Podarcis sicula*.

Las tres especies antes mencionadas de reptiles se engloban dentro del grupo denominado como TSD (*Temperature-dependent Sex Determination*, o Determinación Sexual por Temperatura), grupo de reptiles cuya determinación sexual al nacer es marcada por la temperatura de incubación. Estos reptiles no poseen cromosomas sexuales diferenciados, por lo que la temperatura activa unos genes u otros, lo que a su vez activará o no la enzima aromatasa, responsable de la transformación de andrógenos en estrógenos. Este fenómeno dará lugar, según las condiciones ambientales, al desarrollo de hembras o machos (Valenzuela y Lance, 2004). Esta característica hará que este grupo sea especialmente idóneo para el estudio de los efectos de los EDCs.

### Los reptiles y la contaminación de los ecosistemas

El estudio de la toxicidad de los agentes químicos en los reptiles es particularmente importante porque, como ya se ha indicado, muchas de sus especies están experimentando graves declives. Entre los vertebrados terrestres, la proporción de especies de reptiles amenazadas de extinción es solo ligeramente inferior a la de los anfibios y supera considerablemente la de las aves y los mamíferos (a comienzos de siglo, por ejemplo, reptiles: 8240 especies existentes, con un 30% de ellas en peligro de extinción; aves: 9956, 12%; mamíferos: 5416, 22%; anfibios: 6199, 31%) (Grillitsch y Schiesari, 2000). Directa o indirectamente, la contaminación química es, por tanto, una amenaza importante para este grupo, aunque siguen estando insuficientemente representados en la investigación ecotoxicológica.

Los efectos de los contaminantes en los reptiles son conocidos principalmente para las tortugas y los cocodrilos. Por ejemplo, en ambientes contaminados se ha constatado que ciertas especies de tortugas acumulan selectivamente elevadas cantidades de bifenilos policlorados (PCBs), dieldrín y otros contaminantes persistentes en tejidos y huevos, pudiéndose asociar a un fenómeno de reversión sexual y/o de gónadas anormalmente desarrolladas (Bergeron et al., 1994, Guillette et al., 1995).

El estudio centrado en caimanes estadounidenses (*Alligator mississippiensis*) en Florida, analizando el impacto de altas concentraciones de mercurio desde 1989 en la región sureste de los Estados Unidos fue de los primeros llevados a cabo con esta especie (Rumbold et al., 2002). En el lago Apopka de Florida también se confirmó la influencia del metal (y de otros contaminantes orgánicos) en la baja tasa de eclosión de huevos, los bajos niveles de hormonas circulantes en los animales vivos, la baja población de aligátors jóvenes y la alta e inexplicable mortalidad en adultos, con un descenso en la población de estos reptiles del 90% en cuatro años (Guillette et al., 1995; Woodward et al., 1993). Los datos obtenidos fueron con posterioridad empleados en otros estudios similares que se realizaron a lo largo de Estados Unidos, para medir los niveles de mercurio en esta especie (Jagoe et al., 1998; Ruckel, 1993). Los efectos también pueden ocurrir a través de cambios en los patrones de asignación de energía individual. Por ejemplo, en humedales contaminados con ceniza de carbón, las serpientes de agua (*Nerodia fasciata*) con una gran carga corporal de contaminantes metálicos exhiben tasas metabólicas elevadas, lo que puede resultar en menos energía dedicada a la reproducción o al crecimiento (Hopkins et al., 1999). En todo caso, aunque no se observen efectos letales directos, los trastornos causados por los contaminantes pueden dar lugar a cambios demográficos cuyas consecuencias para las poblaciones son presumiblemente perjudiciales.

Sea como sea, el uso de reptiles como evaluadores indirectos de la presencia de tóxicos en los ecosistemas, salvo en el caso de algunas especies (como, por ejemplo, la ya indicada *Alligator mississippiensis*) se ha llevado a cabo desde hace relativamente poco tiempo. Esto es debido a que, salvo algunas especies, la captura y mantenimiento en cautividad de los reptiles es una tarea difícil de llevar a cabo, y en general los trabajos se han de realizar exclusivamente a partir de los datos (escasos y no completos) obtenidos en poblaciones silvestres.

En Europa, estos estudios se centran sobre todo en *Podarcis sicula*, un pequeño reptil terrestre que se encuentra en altas densidades en los ecosistemas (en la misma proporción de terreno que puede habitar un mamífero pueden cohabitar 10 reptiles) y es fácil de mantener en cautividad (Cardone et al., 2008; Mann et al., 2007). Como esta especie se alimenta básicamente de peces (por lo que acumula tóxicos presentes en ecosistemas hídricos), se ha empleado como bioindicadora de la presencia de residuos tóxicos en granjas orgánicas supuestamente libres de contaminantes en Italia (Verderame et al., 2016), y también ha sido usada para conocer los efectos del metiltiofanato en la tiroides de reptiles (Sciarrillo et al., 2008). En nuestro continente está perfectamente validado el uso de este reptil para valorar los efectos negativos de refinados de petróleo, ciertos metales pesados e incluso diversos compuestos carcinogénicos (Marsili et al., 2009).

La especie *Trachemys scripta* ha sido objeto de numerosos estudios

para probar su eficacia como bioindicador, siendo especialmente importantes los que se realizaron sobre los huevos y crías de esta especie. Así, Nagle et al., (2001) concluyeron que la presencia de petróleo en los lagos y el contacto de éste con los huevos reducía la supervivencia embrionaria. Los adultos de esta especie también han sido estudiados, sobre todo para medir niveles de metales (cadmio, cromo, arsénico, selenio). Los adultos presentaban altos niveles de metales, pero en los huevos sólo el selenio se transfería vía materna, pudiendo ser la causa de las diferencias fenotípicas halladas en las crías de aguas contaminadas y no contaminadas.

### La determinación sexual: reptiles TSD como modelo de estudio

Se ha considerado adecuado realizar una breve revisión acerca de esta característica sexual de ciertas especies de reptiles. Mientras que en mamíferos y aves la determinación sexual del embrión viene dada por su dotación cromosómica o por la presencia o no de genes en los mismos cromosomas (es el caso de las aves), en los reptiles, al igual que en los peces y anfibios, existe un mecanismo distinto de determinación sexual, el ESD, en el cual un grupo de genes es expresado o no según las condiciones ambientales. Los reptiles TSD siguen siendo objeto de numerosos estudios para evaluar cómo la temperatura ambiental es capaz de activar o inactivar determinados genes para dar lugar a la formación de un embrión macho o un embrión hembra.

Distintos estudios realizados en *Alligator mississippiensis* han identificado que los genes SOX9, FoxL2 y WNT11 tienen muchas posibilidades de ser partícipes en esta diferenciación sexual (Yatsu et al., 2016). Estos autores también indican que el incubar a temperaturas que generarían machos (MPT, Male-producing temperature) activaría unos genes, mientras que al incubar para hembras (FPT, Female-producing temperature) se activarían otros. El gen DMRT1 es expresado en embriones incubados para machos, mientras que la aromatasa es expresada en embriones incubados para hembras. Es conocido que el gen DMRT1 es un diferenciador crítico para la determinación de machos (Ferguson-Smith, 2007), mientras que la aromatasa es considerada clave para el desarrollo del ovario y la determinación sexual de hembras, ya que es la responsable de la biotransformación de testosterona en estrógenos (Guiguen et al., 2010).

Respecto a la acción hormonal sobre este mecanismo, al suministrar estrógenos en el periodo sensible de determinación sexual se producían hembras (aunque las temperaturas de incubación eran para machos), por lo que se esperaba que si se suministraban andrógenos durante una incubación a temperaturas para obtener hembras se obtuviesen machos. Sin embargo, al suministrar testosterona en el periodo sensible de temperatura se obtenían hembras (a temperaturas de incubación para hembras) (Amaral et al., 2012). Esto es debido a que a esa temperatura la enzima aromatasa, encargada de transformar testosterona en estrógenos, se encontraba activa.

La elección de este grupo de reptiles ESD, es porque muchos EDCs poseen una estructura molecular muy parecida a los estrógenos, por lo que imitan su comportamiento en el organismo y, al actuar como estrógenos durante el desarrollo embrionario y durante la determinación sexual, son capaces de modificar el sexo del embrión si actúan durante el periodo sensible. Este hecho hace a este grupo un excelente modelo de estudio para valorar los efectos de estos compuestos sobre camadas enteras y su impacto en los ecosistemas, y a la vez sirven como bioindicadores para valorar si un compuesto puede causar disrupción endocrina experimentalmente.

### Disrupción endocrina en el sistema reproductor de hembras

Los ovarios son los órganos más importantes del sistema reproductor femenino de los reptiles, además de ser la diana de actuación de los EDCs. Una alteración en estas gónadas puede ocasionar desde una

bajada de la fertilidad hasta una infertilidad completa si se afecta a su estructura, por lo que los estudios realizados se centran principalmente en estos órganos.

Un estudio en *Eremias argus* valoró el efecto que causaba la  $\alpha$ -cipermetrina en las gónadas de las hembras. Los resultados mostraron que, histológicamente, la  $\alpha$ -cipermetrina no causaba ningún cambio a nivel gonadal, pero sí alteraba la foliculogénesis, ya que el número total de huevos (n=17) en el grupo control era significativamente mayor que en el grupo de animales expuestos (n=10) (Chen et al., 2019).

Los metales pesados, como el cadmio, también pueden causar un fracaso en el éxito reproductivo, alterando funcional y morfológicamente las gónadas. Un estudio realizado en *Trachemys scripta* y *Chrysemys picta* investigó el impacto que ocasionaba el cadmio en los embriones de estas especies y en el aparato reproductor. Se recolectaron huevos de la especie *Chrysemys picta* de una zona potencialmente contaminada (Moody Pond), y simultáneamente se compraron huevos de la especie *Trachemys scripta* a un proveedor. Los huevos fueron expuestos a cadmio desde el día 1 de incubación (5  $\mu$ l de CdCl<sub>2</sub>). Las tortugas de Moody Pond expresaban altas actividades de las actividades enzimáticas etoxiresorufin-0-detilasa, glutatión transferasa y citocromo P4501A, lo que indicaba la exposición a contaminantes orgánicos (Yawetz et al., 1997).

El efecto del cadmio también ha sido estudiado en *Podarcis sicula*. Tras capturar hembras adultas de esta especie, fueron separadas en tres grupos: al primer grupo se le administró una única dosis intraperitoneal de 2  $\mu$ g/g de cadmio, al segundo grupo se le administró estrógenos vía intraperitoneal (20  $\mu$ g/g), después progesterona (25  $\mu$ g/g) y por último FSH (10  $\mu$ g/g) y un grupo control recibió una sola dosis intraperitoneal de suero. Los ovarios del grupo tratado con cadmio presentaban lechos germinales con mayor cantidad de folículos preovulatorios respecto al grupo control. También existía mayor degeneración al observarse mayor número de núcleos picnóticos, aunque esta degeneración también podía observarse en el vitelo de los folículos. Todos estos sucesos son compatibles con los efectos que provocaría un exceso de FSH, por lo que se concluyó que el cadmio actuaba como un FSH- mimético con cierta toxicidad sobre los folículos en crecimiento (Simoniello et al., 2010).

Los metales pesados no son los únicos elementos capaces de ocasionar disrupción endocrina en este órgano de los reptiles. Hamlin et al., (2016) en *Alligator mississippiensis* demostraron el efecto de disrupción endocrina que ocasionaba el nitrógeno (en forma de nitratos) en la regulación hormonal de esta especie. Se recolectaron huevos antes del periodo sensible de temperatura (todos incubados a 30°C) en el lago Woodruff y, al momento del nacimiento, se distribuyeron en tres grupos: el grupo uno fue expuesto a 100 mg/L, el grupo dos a 10 mg/L y el grupo tres fue expuesto a la misma concentración que reciben las aguas municipales. Las hembras obtenidas presentaron elevados niveles de testosterona respecto al grupo control, lo que podría derivar en un síndrome de ovario poliquístico como se ha descrito en roedores y humanos (Comim et al., 2015), ya que el desarrollo ovárico se inicia desde la etapa embrionaria y continúa hasta 5 meses después del nacimiento, creando un periodo sensible a la androgenización.

Los estrógenos sintéticos también han sido estudiados en los reptiles. En *Niveoscincus metallica*, un reptil ovovivíparo, han sido estudiados los efectos que ocasionaba la administración de dietilestilbestrol, DES, en las gónadas femeninas (Parsley et al., 2015). Un total de 80 hembras fueron divididas en 4 grupos de 20 animales cada uno (1 grupo inyectado intraperitonealmente con DES 100  $\mu$ g/kg, 1 grupo inyectado intraperitonealmente con DES 10  $\mu$ g/kg y los respectivos grupos controles a estos grupos). Los embriones hembras de las madres expuestas a DES sufrían anomalías, seguramente porque los embriones se encontraban en el periodo sensible de desarrollo

ovárico, que se prolonga desde la embriogénesis hasta los 5 meses (Kim et al., 2009). Las malformaciones observadas se observaron en los grupos de animales expuestos a DES y consistían en la presencia de folículos poliovulatorios (un folículo contiene más de un oocito). Estas malformaciones no se observaron en las madres, cuyos órganos sexuales estaban plenamente desarrollados, y tampoco se observaron alteraciones durante la gestación.

### Disrupción endocrina en el sistema reproductor de machos

Junto con los ovarios, los testículos son los órganos más “importantes” en el mantenimiento de una especie en un ecosistema, por lo que cualquier compuesto que sea capaz de suprimir o disminuir su función provocará graves consecuencias en el devenir de esa especie. También hay que tener en cuenta que la disfunción hormonal en el periodo embrionario puede ocasionar una reducción del tamaño del pene, lo que también provoca fracaso reproductivo. Por estas razones y por la capacidad de los EDCs de imitar el comportamiento estrogénico (antiguamente llamados estrogénomiméticos) los testículos han sido de los órganos más investigados para valorar la acción de los contaminantes ambientales sobre las especies silvestres.

Un estudio realizado en *Podarcis sicula* en un grupo de 20 machos demostró que los reptiles expuestos a nonilfenol (su alimentación estaba contaminada con un 0,25% de nonilfenol, mientras que su agua estaba contaminada con un 0,05%) durante un periodo de dos semanas presentaban expresión de VTG-mRNA (la vitelogenina, VTG, es exclusiva de hembras) en el tejido testicular. En este mismo estudio se inyectaron estrógenos a otro grupo para comparar los efectos que producían los estrógenos y el nonilfenol en machos, observándose que presentaban la misma degeneración testicular en ambos grupos, mientras que en el grupo control presentaban una histología normal, demostrándose así la capacidad estrogénomimética del nonilfenol (Verderame, 2016).

Otra investigación en *Podarcis* evaluó el efecto que ocasionaba una mezcla de pesticidas (alaclor, bentazona, dicamba, terbutilazina, mesotriona y dimetenamida) sobre los testículos y la función reproductiva. Estos pesticidas producían una disrupción endocrina en la tiroides, además de tener cierta capacidad tóxica en los testículos, lo que ocasionaba en última instancia una disminución de la capacidad reproductiva de los machos (Bicho et al., 2013).

Estos pesticidas no han sido los únicos investigados como posibles EDCs. El diurón ha sido estudiado en machos de *Podarcis sicula*, comprobándose que el diurón producía un daño espermático severo que incluía la reducción del diámetro de los túbulos seminíferos, la pérdida completa de la maduración de espermatozoides y necrosis. Debido a estos daños, los niveles de testosterona también disminuyeron.

El metil-tiofanato también ha sido estudiado en esta misma especie para valorar los efectos que causa en las gónadas. Un estudio realizado por Cardone (2012) demostró la toxicidad que produce este compuesto, observándose vacuolización de las células de Sertoli, presencia de células gigantes multinucleadas, disminución de los centros de germinación celular con pérdida de espermatozoos y reducción de la expresión del mRNA de andrógenos y estrógenos. Estos mismos autores realizaron un experimento en 2014 para describir los efectos que producía el imidacloprid en los testículos de *Podarcis sicula*. El imidacloprid afectaba a la estructura testicular, tanto a las células de Sertoli como a las de Leydig, reduciendo el número de centros germinales, los niveles plasmáticos de estrógenos y andrógenos y causando colapso de los túbulos seminíferos.

En *Alligator mississippiensis*, los estudios realizados en especímenes juveniles procedentes del lago Apopka (el famoso lago donde se observó por primera vez un descenso del número de aligátos debido a los EDCs) concluyeron que los machos exhibían una reducción considerable del tamaño del pene, así como una reducción plasmática de los niveles de testosterona. Además, se observaron diferencias

incluso en los animales capturados en distintas partes del lago: los capturados en la zona más próxima a la central química mostraban estos rasgos más acentuados respecto a los animales que se capturaban en las zonas más distantes de la central e incluso en otros lagos cercanos más limpios. La explicación a la reducción del tamaño del pene y de los reducidos niveles de progesterona se relacionó con la presencia de EDCs (específicamente altos niveles de un metabolito del DDT) durante el desarrollo embrionario, lo que habría provocado un descenso de la testosterona y la consecuente disfunción en el desarrollo del pene (Guillette et al., 1996).

También se realizó un estudio en esta misma especie para comprobar si la atrazina y el 2,4-D, dos herbicidas conocidos como potentes EDCs en mamíferos, causaban alteración reproductiva en embriones. Se recolectaron huevos antes del periodo sensible de temperatura (antes de los 21 días) y se dividieron en 4 grupos: uno control, uno tratado con estradiol, otro con atrazina y un cuarto con 2,4-D. 5 huevos de cada grupo fueron incubados para hembras (30°C) y otros 5 para machos (33°C). También se tomaron muestras hepáticas para determinar la actividad de aromatasa justo después de la eutanasia. Los resultados obtenidos demostraron que tanto atrazina como 2,4-D no producían alteración reproductiva en esta especie durante este estadio (Spiteri et al., 1999), pero no se descartaba que causaran alteraciones en adultos de esta misma especie, ya que en otras especies de mamíferos se había demostrado que algunos compuestos solo producen problemas reproductivos en adultos (Biegel et al., 1995).

Respecto al género *Trachemys*, se expusieron embriones de *T. scripta elegans* a clordano y a una mezcla de PCBs. Los huevos fueron incubados a 28,6 °C de temperatura (temperatura a la que empiezan a salir hembras) y el tratamiento se realizó en la tercera mitad del desarrollo. Al nacimiento se obtuvieron un total de 195 animales (59 del grupo control, 51 tratados con el PCB Aroclor 1242, 43 tratados con clordano y 42 animales tratados con trans-nonaclor). Tanto Aroclor 1242 como clordano produjeron un descenso de los niveles de testosterona en machos, mientras que en las hembras se producía un descenso de los niveles de testosterona, DHT (dihidroxitestosterona) y progesterona. El Aroclor 1242 actuaba incrementando la actividad de la aromatasa, lo que explicaba el descenso de testosterona de machos y hembras (transforma la testosterona en estrógenos). El clordano indujo un aumento del ratio de hembras obtenidas, por lo que, sumado a los resultados obtenidos de bajos niveles de testosterona, DHT y progesterona, se concluyó que el clordano era un potente anti-andrógeno que complementa los efectos de los estrógenos (Willingham et al., 2000).

Neuman-Lee y Janzen (2011) analizaron el efecto de la atrazina sobre la modificación del sexo embriogénico en el género *Trachemys*, y sus resultados coincidieron con los de Spiteri et al., (1999), no observándose modificación del sexo debido a este compuesto, aunque no se descartaba que pudiera causar disfunción endocrina en adultos.

Un estudio realizado en la Reserva Militar de Massachussets en *Chrysemys picta* valoró el impacto de la contaminación ambiental en sus gónadas. Los machos procedentes de este hábitat presentaban reducción del tamaño y peso testicular, lo que se correspondía con una reducción del tamaño de los túbulos seminíferos y de la producción de espermatozoides. Histológicamente, se observó una mayor apoptosis en los testículos de los animales expuestos a mayores niveles de contaminantes, concretamente a niveles muy elevados de cadmio (Kitana et al., 2007).

### Conclusiones

Una vez revisados algunos de los trabajos que sobre reptiles y EDCs se han podido realizar en los últimos años, conviene reflexionar acerca de hacia dónde es previsible que evolucione este problema. La liberación de EDCs en el medio ambiente se verá afectada invariablemente por las tendencias demográficas y económicas de la

población mundial. Las poblaciones en crecimiento conducirán a mayores emisiones, incluso, si el uso o el consumo per cápita se mantiene constante.

Los avances recientes y futuros en química analítica permitirán la detección de más compuestos químicos en concentraciones más bajas de lo que es posible en este momento, y a un costo que permitirá una expansión de la monitorización de compuestos químicos, en programas intensos de seguimiento. Asociado a este hecho, el aumento en la cantidad de datos científicos sobre la presencia de bajas concentraciones de EDCs reconocidos en la vida silvestre y el medio ambiente aumentará las demandas de investigación sobre los efectos de la exposición a niveles muy bajos en individuos y poblaciones, lo que debería redundar, no ya solo en un mejor conocimiento sino en mayores medidas proteccionistas frente a esta problemática. El llegar a interpretar los ingentes conjuntos de datos que se obtendrán, y sobre todo desarrollar estudios predictivos (es este un campo aún en sus inicios en la toxicología ambiental) a nivel individual y especialmente a nivel de la población, será un desafío sustancial que requerirá tanto de multitud de científicos implicados como de sociedades, entidades e instituciones comprometidos en esta labor (Amaral et al., 2012).

Y justamente, como se intuye, es este uno de los más relevantes campos de batalla del futuro: existe una incertidumbre sustancial, y seguirá existiendo, sobre los posibles efectos ambientales negativos de diferentes EDCs y el grado en que éstos pueden predecirse antes de su introducción. El desafío para los formuladores de políticas ambientales en el diseño de regímenes regulatorios será pues equilibrar estos riesgos con los beneficios socioeconómicos derivados del empleo de las más variadas sustancias químicas. No se trata de prohibir por prohibir, sino de constatar qué sustancias no deben ser empleadas, y si lo son, no deben ser nunca liberadas al medio ambiente sin control.

Y hay un nuevo factor en consideración que sin duda vendrá a complicar esta ecuación: es probable que el cambio climático tenga influencias negativas en la relación entre los EDCs y la vida silvestre. Los modelos no están completamente de acuerdo sobre cómo cambiarán las concentraciones ambientales, particularmente en el Ártico, pero todas las zonas del planeta se van a ver afectadas. Seguramente las temperaturas medias más altas aumentarán la tasa de volatilización (evaporación) y la degradación de los contaminantes químicos, incluidos los EDCs (eso será al menos inicialmente beneficioso), pero la reducción de las precipitaciones prevista en muchas regiones (y España es un lugar negativamente destacado en este aspecto) llevará a flujos más bajos y menos dilución de las aguas residuales, lo que aumentará las concentraciones de EDCs en los ecosistemas. Y también influirán los casos contrarios: se espera un aumento en los eventos de lluvias extremas, lo que puede afectar a la frecuencia de los episodios de contaminación puntual muy elevada de las tierras de cultivo y de desagües en el agua del río, liberando súbitamente grandes cantidades de contaminantes a los ecosistemas. También el cambio climático tendrá un efecto comportamental directo: seguramente muchas especies silvestres se vean sometidas a un fuerte estrés, con lo que verán disminuida su capacidad para soportar más estrés en forma de EDCs.

## Referencias

- Amaral MJ, Carretero MA, Bicho RC, Soares AMVM, Mann RM. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies - Part 1 Field demographics and morphology. *Chemosphere* 2012; 87(7), 757-764.
- Bergeron JM, Crews D, McLachlan JA. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 1994; 102(9), 780-781.
- Bicho RC, Amaral MJ, Faustino AM, Power DM, Rêma A, Carretero MA, Soares AMVM, Mann RM. Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study. *Ecotox.* 2013; 22(1), 156-165.
- Biegel LB, Liu RCM, Hurtt ME, Cook JC. Effects of ammonium perfluorooctanoate (C8) on Leydig cell function: *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo* studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995; 134, 18-25.
- Burger J, Gochfeld M, Rooney AA, Orlando EF, Woodward AR, Guillette JR. Metals and metalloids in tissues of American alligators in three Florida lakes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000; 38, 501-508.
- Burlington H, Lindeman VF. The effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels. *Prof. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950; 74(1), 48-51.
- Cardone A, Comitato R, Angelini F. Spermatogenesis, epididymis morphology and plasma sex steroid secretion in the male lizard *Podarcis sicula* exposed to diuron. *Environ. Res.* 2008; 108(2), 214-223.
- Cardone A. Testicular toxicity of methyl thiophanate in the Italian wall lizard (*Podarcis sicula*): morphological and molecular evaluation. *Ecotox.* 2012; 21(2), 512-523.
- Chen L, Wang D, Zhang W, Wang F, Zhang L, Wang Z, Li Y, Zhou Z, Diao J. Ecological risk assessment of alpha-cypermethrin-treated food ingestion and reproductive toxicity in reptiles. *Ecotox. Environ. Safe.* 2019; 171, 657-664.
- Comim FV, Hardy K, Robinson J, Franks S. Disorders of follicle development and steroidogenesis in ovaries of androgenised foetal sheep. *Eur. J. Endocrinol.* 2015; 225(1), 39-46.
- Eisenreich KM, Dean KM, Ottinger MA, Rowe CL. Comparative effects of *in ovo* exposure to sodium perchlorate on development, growth, metabolism, and thyroid function in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) and red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2012; 156, 166-170.
- Ferguson-Smith M. The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of DMRT1. *Sex. Dev.* 2007; 1(1), 2-11.
- Godfray HCJ, Stephens AEA, Jepson PD, Jobling S, Johnson AC, Matthiessen P, Sumpter JP, Tyler CR, McLean AR. A restatement of the natural science evidence based on the effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife. *Proc. R. Soc. B* 2019; 286, 20182416.
- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010; 165(3), 352-366.
- Guillette LJ, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. Organization versus activation: The role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health. Persp.* 1995; 103(7), 157-164.
- Guillette LJ, Pickford DB, Crain DA, Rooney AA, Percival HF. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1996; 101(1), 32-42.
- Grillitsch B, Schiesari L. The ecotoxicology of metals in reptiles. En: Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest S. (Eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. CRC Press, Boca Ratón, EE.UU. 2000. p. 337-448.
- Hamlin HJ, Edwards TM, McCoy J, Cruze L, Guillette LJ. Environmentally relevant concentrations of nitrate increase plasma testosterone concentrations in female American alligators

- (*Alligator mississippiensis*). Gen. Comp. Endocrinol. 2016; 238, 55-60.
19. Hopkins WA, Rowe CL, Congdon JD. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snakes (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. Environ. Toxicol. Chem. 1999; 18, 1258-1263.
  20. Hopkins WA. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. Environ. Toxicol. Chem. 2000; 19(10), 2391-2393.
  21. IUCN. International Union for Conservation of Nature. <https://www.iucn.org/es>, 2010.
  22. Jagoe C, Arnold-Hill B, Yanochko G, Winger P, Brisbin Jr I. Mercury in alligators (*Alligator mississippiensis*) in the southeastern United States. Sci. Total Environ. 1998; 213, 255-262.
  23. Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T. Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. Biol. Reprod. 2009; 81, 1002-1009.
  24. Kitana N, Won SJ, Callard IP. Reproductive deficits in male freshwater turtle *Chrysemys picta* from Cape Cod, Massachusetts. Biol. Reprod. 2007; 76(3), 346-352.
  25. Mann RM, Sánchez-Hernández JC, Serra EA, Soares AM. Bioaccumulation of Cd by a European lacertid lizard after chronic exposure to Cd-contaminated food. Chemosphere 2007; 68(8), 1525-1534.
  26. Manolis SC, Webb GJ, Britton AR. Cocodrilians and other Reptiles: Bioindicators of Pollution. The Finniss River; a Natural Laboratory of Mining Impacts - Past, Present and Future. ANSTO, Sydney (libro de resúmenes de conferencia internacional), 2002.
  27. Marsili L, Casini S, Mori G, Ancora S, Bianchi N, Agostino AD, Ferraro M, Fossi MC. The Italian wall lizard (*Podarcis sicula*) as a bioindicator of oil field activity. Sci. Total Environ. 2009; 407(11), 3597-3604.
  28. Nagle RD, Rowe CL, Congdon JD. Accumulation and selective maternal transfer of contaminants in the turtle *Trachemys scripta* associated with coal ash deposition. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001; 40(4), 531-536.
  29. Neuman-Lee LA, Janzen FJ. Atrazine exposure impacts behavior and survivorship of neonatal turtles. Herpetologica 2011; 67(1), 23-31.
  30. Parsley LM, Wapstra E, Jones SM. In utero exposure to the oestrogen mimic diethylstilbestrol disrupts gonadal development in a viviparous reptile. Reprod. Fertil. Dev. 2015; 27(7), 1106-1114.
  31. Ruckel SW. Mercury concentrations in alligator meat in Georgia. Proc. Annu. Conf. SE. Assoc. Fish Wild Agencies 1993; 47, 287-292.
  32. Rumbold DG, Fink LE, Laine KA, Niemczyk SL, Chandrasekhar T, Wankel SD, Kendall C. Levels of mercury in alligators (*Alligator mississippiensis*) collected along a transect through the Florida Everglades. Sci. Total Environ. 2002; 297, 239-252.
  33. Sciarrillo R, De Falco M, Virgilio F, Laforgia V, Capaldo A, Gay F, Valiente S, Varano L. Morphological and functional changes in the thyroid gland of methyl thiophanate-injected lizards, *Podarcis sicula*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2008; 55(2), 254-261.
  34. Simoniello P, Trinchella F, Scudiero R, Filosa S, Motta CM. Cadmium in *Podarcis sicula* disrupts prefollicular oocyte recruitment by mimicking FSH action. Open Zool. J. 2010; 3, 37-41.
  35. Spiteri ID, Guillette LJ, Crain DA. The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed *in ovo* to atrazine, 2, 4-D, or estradiol. Toxicol. Ind. Health 1999; 15(1-2), 181-186.
  36. Valenzuela N, Lance V. Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Smithsonian Books, Washington, 2004.
  37. Verderame M. Manure as nonylphenol and estradiol promotes the extrahepatic synthesis of vitellogenin in the testis of a terrestrial vertebrate, the lizard *Podarcis sicula*. Austin Biol. 2016; 1(2), 1006.
  38. Verderame M, Limatola E, Scudiero R. Estrogenic contamination by manure fertilizer in organic farming: a case study with the lizard *Podarcis sicula*. Ecotox. 2016; 25(1), 105-114.
  39. WHO (World Health Organization) (2013). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals- 2012. WHO Library Cataloguing -in-Publication Data, Ginebra.
  40. Willingham E, Rhen T, Sakata JT, Crews D. Embryonic treatment with xenobiotics disrupts steroid hormone profiles in hatchling red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). Environ. Health Perspect. 2000; 108(4), 329-332.
  41. Woodward A, Percival H, Jennings M, Moore C. Low clutch viability of American alligators on lake Apopka. Florida Scientist. 1993; 56(1), 52-63.
  42. Yatsu R, Miyagawa S, Kohno S, Parrott BB, Yamaguchi K, Ogino Y, Miyakawa H, Lowers HR, Shigenobu S, Guillette Jr LJ, Iguchi T. RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during *Alligator mississippiensis* temperature-dependent sex determination and differentiation. BMC Genomics 2016; 17(1), 1-13.
  43. Yawetz A, Benedek-Segal M, Woodin B. Cytochrome P4501A immunoassay in freshwater turtles and exposure to PCBs and environmental pollutants. Environ. Toxicol. Chem. 1997; 16, 1802-1806.

# Ingesta alcohólica actual. Informe técnico de tasa de alcoholemia retrospectiva. Estudio de dos casos.

De Pablo Ruiz J<sup>1</sup>, Anadón Baselga MJ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Policía municipal Madrid, policía judicial del tráfico

<sup>2</sup>Directora de departamento de medicina legal, psiquiatría y anatomía patológica. Facultad de medicina – Universidad Complutense de Madrid

**Resumen:** El presente artículo trata de ilustrar la actividad policial, dentro de parámetros legales, relacionada con cuestiones de intoxicación, consumo y/o abuso de alcohol etílico. La presente recopilación bibliográfica actualiza la curva de alcoholemia, su evolución a través del tiempo tras una ingesta alcohólica actual, ingiriendo varias consumiciones alcohólicas. Se realiza la exposición de dos casos prácticos, con formato de informe técnico. En el presente, se introducen datos lícitos y objetivos para que los resultados calculados tomen carácter judicial y que el informe técnico esclarezca unos hechos probatorios y sólidos en la vista oral de un juicio del Ministerio de Justicia. Tras la obtención de resultados se procede a la lectura de los mismos, resultando ser concluyentes ante unos hechos y la legislación vigente.

**Palabras clave:** Alcohol; conducción; Widmark; aire; sangre.

**Abstract:** *Current Alcohol Intake. Technical Report on Retrospective Alcohol Levels. A Two-Case Study*

This article aims to illustrate police activity, within legal parameters, related to issues of intoxication, consumption and/or abuse of ethyl alcohol. The present bibliographic compilation updates the blood alcohol level curve, its evolution over time after a current alcohol intake, with several alcoholic intakes. Two-case studies are presented in the format of a technical report. In this case, lawful and objective data are introduced so that the calculated results take on a judicial character and the technical report clarifies solid and probative facts in the oral hearing of a court trial of the Ministry of Justice. The results obtained proved to be conclusive given the facts and current legislation.

**Keywords:** Alcohol; driving; Widmark; air; blood.

## Introducción

En la Ley Orgánica 2/1986, de Fuerzas y Cuerpos de Seguridad, en su artículo 53, los cuerpos de Policía Local deberán entre sus funciones, Instruir atestados por accidentes de circulación dentro del casco urbano y de ello se encarga la Comisaría de Policía Judicial de Tráfico (BOE-A-1986-6859).

En la Ley 1/2018, de Coordinación de Policías Locales de la Comunidad de Madrid, en su artículo 11 apartado c, los cuerpos de Policía Local deberán entre sus funciones, Instruir atestados por accidente de circulación y delitos contra la seguridad vial dentro del casco urbano y en las vías de titularidad municipal (BOE-A-2018-7516).

En el Real Decreto de 14 de septiembre de 1882 por el que se aprueba la Ley de Enjuiciamiento Criminal, en su artículo 457 distingue entre peritos titulares y no titulares, atribuyendo dicha condición a los que «... careciendo de título oficial, tienen, sin embargo, conocimientos o práctica especiales en alguna ciencia o arte» (Real Decreto de 14 de septiembre de 1882). Por su parte, el artículo 796.1.7ª, incluido en la misma ley, mediante la Ley Orgánica 5/2010, de 22 de junio de 2010, al regular las pruebas de detección de drogas a conductores, introduce un nuevo concepto jurídico, como es el «agente de la policía judicial de tráfico con formación específica» (BOE-A-2010-9953).

El estudio de Erik Matteo Prochet Widmark (1932) *Prediction of blood alcohol concentrations in human subjects*, en su gráfica de la curva de alcoholemia, y el estudio de Kurt M. Dubowski (1980) *Alcohol Determination in the Clinical Laboratory* están realizados en una ingesta alcohólica inmediata (figura 1). No obstante, en la actualidad

el alcohol se consume degustándolo despacio e ingiriendo varias consumiciones espaciadas a través del tiempo.



Figura 1. Curva de alcoholemia de Widmark

En este contexto, el presente texto trata de ilustrar la actividad policial relacionada con cuestiones de intoxicación, consumo y/o abuso de alcohol etílico mediante la exposición de dos casos prácticos.

## Material y Métodos

*Fundamento teórico* (Anadón, 2022; De Pablo, 2022)

Se ilustra la curva de alcoholemia actualizada y su evolución a través del tiempo tras una ingesta alcohólica actual, ingiriendo varias consumiciones alcohólicas. Toda la recopilación bibliográfica referenciada representa un nivel lícito y farmacocinético de ingesta, distribución y eliminación del alcohol etílico en un organismo. Para ello se tomarán parámetros biológicos, moleculares, sanitarios, forenses, policiales y legales en orden de prioridad inverso.

Se comienza cronológicamente una ingesta alcohólica actual:  $\gamma$  (gamma): tiempo total;  $\zeta$  (sigma): Tasa alcohólica mg/l en aire espirado (ae). Se produce ingesta alcohólica a través del aparato digestivo: tiempo: 0 minutos; Tasa alcohólica: 0 mg/l ae.

Comienza la absorción del alcohol etílico a través de los capilares sanguíneos que rodean el aparato digestivo a la sangre y a los 5 minutos de haber ingerido alcohol, este se puede detectar en el torrente sanguíneo: tiempo: 5 minutos; Tasa alcohólica: 0 mg/l ae. Comienzan dos procesos simultáneamente: primero, da comienzo la fase de ascenso en la curva de alcoholemia con una duración de 30 minutos, la cual se divide en tres partes, ya que el 20 % del alcohol etílico ingerido se empezará a absorber al torrente sanguíneo por el estómago —contará con una inclinación media—, el 70 % se absorbe por el intestino delgado —la inclinación de la recta será pronunciada— y el 10 % por el colon —su inclinación será baja—. Cabe señalar que dicha absorción no es constante. Y a la vez comienza el factor eliminación del alcohol del organismo mediante la exhalación, la sudoración, la orina y las heces —este factor, tras realizar cálculos en personas de diferentes sexos, masas y diferentes ingestas alcohólicas en cantidad y graduación, cuenta con un descenso medio de 0,01 mg/l en aire espirado a la hora, 0,005 mg/l en aire espirado a los 30 minutos. Significad que biológicamente el 90 % del alcohol etílico ingerido es detoxificado por los hepatocitos del hígado en dos fases y el 10 % es eliminado del organismo mediante el factor eliminación. Si nos referenciamos al estudio de Widmark, una premisa fundamental para la aplicación de su segunda fórmula es que llega hasta un máximo de 10 horas desde la

\*e-mail: jsavi.de.pablo@gmail.com

prueba de alcoholemia hasta los hechos que se quiere conocer, premisa que es así ya que biológicamente el alcohol es eliminado del organismo entre 10 y 19 horas tras su ingesta, por lo que el factor eliminación del alcohol del organismo se realizará constante de un 1 % a la hora y sólo durante las 10 primeras horas. Este 1 % de alcohol ingerido viene a ser el 0,01 mg/l en aire espirado a la hora calculado y citado en este párrafo. El factor eliminación hace que la tasa alcohólica ingerida que porta un líquido alcohólico no ascienda hasta su valor máximo— tiempo:  $5 + 30 = 35$  minutos; Tasa alcohólica:  $\zeta - 0,005$  mg/l ae.

A los 35 minutos de haber comenzado la ingesta alcohólica comienza la fase de estabilización del alcohol o meseta en la curva de alcoholemia que dura 60 minutos, influyendo el factor eliminación del alcohol del organismo simultáneamente. Termina la fase de estabilización descendiendo ligeramente la tasa alcohólica anterior menos 0,01 mg/l en aire espirado —factor eliminación— concluyendo, la fase de meseta, a los 95 minutos de haber empezado a ingerir alcohol: tiempo:  $5 + 30 + 60 = 95$  minutos; Tasa alcohólica:  $\zeta - 0,005 - 0,01$  mg/l ae.

Al término de la misma, comienza la fase de descenso en la curva de alcoholemia, llevada a cabo por la detoxificación del alcohol etílico a través del hígado. Según datos biológicos y moleculares un hígado detoxifica a una velocidad constante y lenta de 10 y 20 mg/dl de sangre a la hora, si bien es cierto que matinalmente se detoxifica más rápido, aparte de seguir eliminando el alcohol mediante el factor eliminación del alcohol del organismo pero, como se definió en introducción, partimos de una base en orden legal, policial, forense, sanitario, molecular y biológico por lo que se toma el dato del Ministerio de Sanidad que arroja de la detoxificación del alcohol a través del hígado, siendo de 0,12 g/l de sangre a la hora (Ministerio de Sanidad, 2024), 0,06 mg/l en aire espirado a la hora, aceptado en España por la legislación vigente (Real Decreto 2282/1998). Se le suma el factor eliminación del alcohol resultando un 0,07 mg/l en aire espirado menos a la hora.

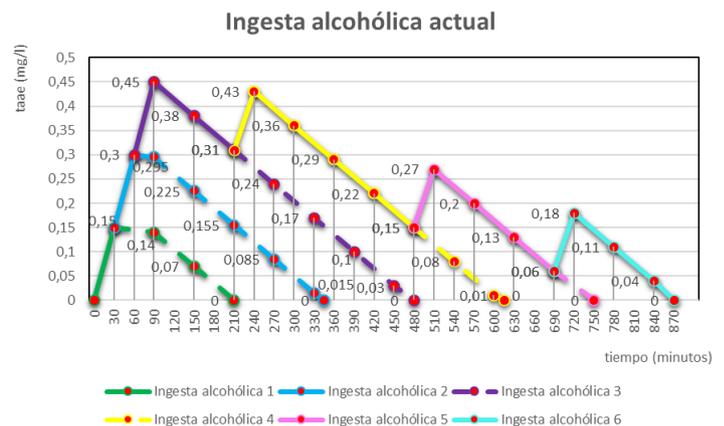
Cabe aclarar que la fase de descenso de la curva de alcoholemia es representada, tras estudios realizados en sangre, como una curva, y si atendemos a la velocidad de detoxificación de un hígado es constante y lenta, por lo que debería ser representada como una recta declinada. El factor eliminación del alcohol en el cuerpo humano es el que hace tirar para abajo esa recta declinada y convertirla en una curva, ya que dicho factor eliminación no es constante biológicamente, aunque aquí se vaya a tratar como una constante durante las 10 primeras horas. Con esto se acorta el tiempo de eliminación del alcohol en un organismo. Por lo que, a los 60 minutos de haber comenzado la fase de descenso en la curva de alcoholemia, 155 minutos tras el comienzo de ingesta alcohólica, se tendrían los siguientes resultados: tiempo:  $5 + 30 + 60 + 60 = 155$  minutos; Tasa alcohólica:  $\zeta - 0,005 - 0,01 - (0,06 + 0,01)$  mg/l ae. Esta operación se realiza hasta llegar a una tasa de alcoholemia de 0 —teniendo en cuenta que el factor eliminación sólo se implementa 10 veces, las 10 primeras horas, posteriormente habrá que restar sólo la detoxificación del hígado, 0,12 g/l de sangre a la hora, 0,06 mg/l en aire espirado a la hora—. Los resultados serían los siguientes: tiempo:  $5 + 30 + 60 + 60 + \dots = \gamma$  minutos; Tasa alcohólica: 0 mg/l ae



**Figura 2.** curva de alcoholemia actualizada —ascenso total de consumición 0,295 mg/l en aire espirado, menos 0,005 mg/l de factor eliminación: 0,29 mg/l en aire espirado—:

Respecto a esta gráfica se puede trabajar en una ingesta alcohólica actual prolongada a través del tiempo tras ingerir varias consumiciones alcohólicas:

Si se observa la ingesta alcohólica actual (figura 3), se puede acreditar que a partir de los 95 minutos después de comenzar a ingerir alcohol el hígado comienza la detoxificación del mismo a ritmo constante y lento, por lo que si se sigue ingiriendo alcohol antes que el anterior haya sido eliminado y detoxificado del organismo —ingestas alcohólicas 2, 3, 4— toda vez finalizada la nueva fase de ascenso en la curva de alcoholemia, la cual se sumará a la tasa alcohólica portada en este instante de tiempo de nueva ingesta alcohólica, la fase de estabilización o meseta del etanol se pierde, influyendo a la vez en el resultado de tasa alcohólica que genera el mismo líquido alcohólico ingerido anteriormente, ya que se está produciendo simultáneamente la absorción del etanol por todo el aparato digestivo y la eliminación y detoxificación del mismo. Por lo que a partir de 95 minutos tras la primera ingesta alcohólica, si se continúa ingiriendo alcohol nunca existirá fase de estabilización del etanol o meseta en la curva de alcoholemia. Así, las tres primeras ingestas alcohólicas (figura 3) han tomado un valor de 0,15 mg/l en aire espirado, sería un total de 0,155 mg/l menos 0,005 de factor eliminación en 30 minutos, durante la fase de ascenso en la curva de alcoholemia, pero a partir de la ingesta alcohólica 3 —línea morada— ya no existe fase de estabilización o meseta del etanol en la curva de alcoholemia. Y a partir de la ingesta alcohólica 4 —línea amarilla—, cada consumición tomaría un valor de 0,12 mg/l en aire espirado, ya que el hígado se encuentra detoxificando el etanol simultáneamente. Esta curva de alcoholemia actualizada e ingesta alcohólica actual, junto con todos los parámetros descritos, se encuentran desarrolladas en un algoritmo de eliminación y detoxificación del alcohol en un cuerpo humano, y programadas en la aplicación para terminales: Actúa como un organismo virtual de eliminación y detoxificación del alcohol y además vaticina la hora, al minuto, en la que un conductor de un vehículo puede conducir de forma segura arrojando una tasa alcohólica negativa en un control de alcoholemia según legislación vigente, siempre y cuando la sintomatología alcohólica que sufra se lo permita. La gráfica de ingesta alcohólica actual toma forma de olas de mar, como con crestas. Se implementa este fundamento teórico en los casos prácticos policiales.



**Figura 3.** Cálculo Ingesta Alcohólica Actual, varias exposiciones.

### Caso 1

Mujer joven que, circulando con su vehículo turismo a las 15:30 horas por una calle provoca un accidente de tráfico no respetando una señal vertical de stop que hubiese debido. Que se detiene y se baja del vehículo para observar lo ocurrido y el conductor contrario detecta signos que dicha conductora se encuentra bajo la influencia de bebidas alcohólicas. Esta conductora, al rato, abandona el lugar de los hechos sin esperar a la llegada de la policía.

Es localizada en su domicilio por agentes de Policía Municipal de Madrid a las 20:17 horas y manifiesta espontáneamente que «hace treinta minutos ha tomado dos copas de vino mientras comía».

Se le practica prueba de alcoholemia en aire espirado mediante aparato etilómetro verificado (Real Decreto; Real Decreto 1428/2003 6/2015), obteniendo unos resultados de 0,28mg/l y 0,26 mg/l en aire espirado a las 20:25 y 20:37 horas respectivamente, valores que rozan el límite legalmente permitido 287 minutos después del accidente.

Dicha conductora es detenida por agentes de Policía Municipal de Madrid como presunta autora de dos delitos, uno de lesiones graves por imprudencia menos grave y otro de abandono del lugar del accidente (BOE-A-1995-25444).

*Objeto del informe:* El equipo instructor de Policía Municipal de Madrid solicita la emisión de un informe técnico que responda a la siguiente cuestión: «si es posible que, habiéndose producido el accidente a las 15:30 horas, como consta en atestado policial, la ingesta alcohólica manifiesta espontáneamente por la detenida y transcrita en Comparecencia con detenida, ha influido en la producción del mismo, o si por el contrario, los resultados de la prueba de alcoholemia son más coherentes con una ingesta superior en el momento del accidente».

*Utilidad del informe:* Conocer la tasa de alcoholemia que porta un conductor a una hora anterior determinada y que esclarezca unos hechos de una forma real y objetiva con parámetros legales.

La documentación obrante en Atestado policial consiste en la comparecencia con detenida, parte de alcoholemia redactado por agentes de Policía Municipal de Madrid y los tickets comprobantes de las pruebas de detección de alcohol en aire espirado.

Manifiesta espontáneamente que «hace treinta minutos ha tomado dos copas de vino mientras comía», sin especificar qué marca de vino.

## Caso 2

Varón de mediana edad que, circulando con su vehículo turismo a las 22:30 horas por una calle comete un atropello dentro de un paso para peatones regulado por semáforo el cual se encontraba en fase roja para vehículos y en fase verde para peatones. Que se detiene y se baja del vehículo para observar lo ocurrido y varios testigos detectan signos que dicho conductor se encuentra bajo la influencia de bebidas alcohólicas. Este conductor, al rato, abandona el lugar de los hechos sin esperar a la llegada de policía.

Es localizado en su domicilio por agentes de Policía Municipal de Madrid a las 4:55 horas. Se le practica prueba de alcoholemia en aire espirado mediante aparato etilómetro verificado (Real Decreto; Real Decreto 1428/2003 6/2015), arrojando unos resultados de 0,31 mg/l y 0,24 mg/l a las 5:11 y 5:38 horas respectivamente, valores que rozan el límite legalmente permitido 428 minutos después del atropello.

Dicho conductor es detenido por agentes de Policía Municipal de Madrid como presunto autor de dos delitos, uno de lesiones graves por imprudencia menos grave y otro de abandono del lugar del accidente (BOE-A-1995-25444).

Horas más tarde se le toma declaración, junto con letrado presente, y manifiesta que «mientras comía, sólo bebió tres cervezas durante la tarde de ayer».

*Objeto del informe:* El equipo instructor de Policía Municipal de Madrid solicita la emisión de un informe técnico que responda a la siguiente cuestión: «si es posible que, habiéndose producido el atropello a las 22:30 horas, como consta en atestado policial, la ingesta alcohólica manifiesta por el detenido en la tarde de ayer transcrita en Diligencia de toma de declaración a detenido, ha influido en la producción del mismo, o sí por el contrario, los resultados de la prueba de alcoholemia son más coherentes con una ingesta superior en el momento del atropello».

*Utilidad del informe:* Conocer la tasa de alcoholemia que porta un conductor a una hora anterior determinada y que esclarezca unos hechos de una forma real y objetiva con parámetros legales.

La documentación obrante en Atestado policial consiste en el parte de

alcoholemia redactado por agentes de Policía Municipal de Madrid, tickets comprobantes de las pruebas de detección de alcohol en aire espirado y declaración transcrita en folio Diligencia de toma de declaración a detenido, junto con su letrado presente.

En su declaración manifiesta que «mientras comía sólo bebió tres cervezas durante la tarde de ayer», sin especificar qué marca de cerveza.

## Resultados y Discusión

Para dar respuesta a esta solicitud se procede de la siguiente manera:

Consideraciones previas (Real Decreto 6/2015; Real Decreto 1428/2003): el cálculo de tasa de alcoholemia retrospectiva en sangre partiendo de un valor conocido, se podrá realizar si se cumplen cuatro premisas: 1. Las estimaciones idóneas se pueden realizar mientras se detecte una cantidad mínima de 0,1 g/l sangre. 2. El ratio de equivalencia entre las mediciones realizadas aire-sangre se realizarán con el factor de corrección 2000:1. Aceptado en España por la legislación vigente (una tasa de alcoholemia de 0,25 mg/l en aire espirado equivale a 0,50 g/l de sangre)<sup>13</sup>. 3. El tiempo idóneo transcurrido entre el hecho y las pruebas de alcoholemia debe oscilar entre 1 y 10 horas. 4. Nos debemos encontrar en la fase de descenso de la curva de alcoholemia. El resultado de la segunda prueba de alcoholemia (si existe) deberá ser menor que el de la primera.

El informe técnico se presenta mediante la siguiente investigación: cálculo de tasa alcohólica mínima y máxima que presenta la detenida tras la ingesta alcohólica declarada y compararla con sus resultados en la prueba de alcoholemia arrojados en el etilómetro y Cálculo de tasa de alcoholemia retrospectiva a la hora del accidente.

*1. Cálculo teórico de tasa de alcoholemia tras manifestación espontánea de ingesta alcohólica transcrita en Comparecencia con detenida o tras manifestación de ingesta alcohólica declarada en Diligencia de toma de declaración a persona detenida* (Instituto Legal de Valencia, 2013).

Tras la absorción del aparato digestivo del etanol al torrente sanguíneo, este se distribuye a través del agua corporal en función del coeficiente de partición grasa/agua, por lo que se establece la relación con la cantidad de agua de un organismo, la proporción de etanol que se alcance en cada tejido o fluido por el volumen de distribución, que hace referencia a la relación existente entre la cantidad total de etanol en el cuerpo con la concentración plasmática. El cálculo de la alcoholemia mínima y máxima que genera un líquido alcohólico se muestra en la tabla 1 para los dos casos estudiados. Todos los valores no referidos por la detenida se tomarán de la tabla elaborada por la DGT (Dirección General de Tráfico, 2023) y siempre siendo más favorables y garantistas.

Caso 1: Manifiesta que «hace treinta minutos ha tomado dos copas de vino mientras comía». Por lo que se toman dos copas de vino de 100 ml cada una, por equivalencia 100 cc, de una graduación de 12 grados: de cada 100 cc de ese líquido, 12 cc son de etanol.

Caso 2: Manifiesta que «mientras comía, sólo bebió tres cervezas durante la tarde de ayer». Por lo que se toman tres tercios de cerveza de 330 ml cada uno, por equivalencia 330 cc, de una graduación de 5 grados: de cada 100 cc de ese líquido, 5 cc son de etanol.

La ingesta de 200 cc de vino (Caso 1) de una graduación de 12° genera una tasa de alcoholemia mínima y máxima en aire espirado de 0,260826446 mg/l y 0,318787878 mg/l. La ingesta de 990 cc de cerveza (Caso 2) de una graduación de 5° genera una tasa de alcoholemia mínima y máxima en aire espirado de 0,319080882 mg/l y 0,410246848 mg/l.

Se tiene en cuenta que en la manifestación también había comido a la vez que ingería vino: la comida incrementa el flujo sanguíneo hepático y favorece la exposición del etanol a las enzimas oxidativas localizadas principalmente en el hígado, lo que, a su vez, facilita la eliminación del alcohol. Es decir, la comida, desde el estómago y durante las 6 – 8 horas

**Tabla 1:** Cálculo de la alcoholemia mínima y máxima

Cálculo etanol (g)	$A = V \cdot d \cdot g$
<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>
$A = 200 \text{ cc} \cdot 0,789 \text{ g/cm}^3 \cdot 0,12 \text{ cc}$	$A = 990 \text{ cc} \cdot 0,789 \text{ g/cm}^3 \cdot 0,05 \text{ cc}$
$A = 18,936 \text{ g}$	$A = 39,0555 \text{ g}$
Tasa alcoholemia mínima - máxima	$A = m \cdot r \cdot c$
<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>
0,521652892 - 0,637575757 g/l sangre 0,260826446 - 0,318787878 mg/l ae	0,638161764- 0,820493697 g/l sangre 0,319080882- 0,410246848 mg/l ae
0,321652892- 0,437575757 g/l sangre 0,160826446- 0,218787878 mg/l ae	0,438161764- 0,620493697 g/l sangre 0,219080882- 0,310246848 mg/l ae

A: cantidad de alcohol ingerido expresada en gramos (g) (Etanol)

V: volumen de bebida ingerida expresada en centímetros cúbicos (cc)

d: densidad de alcohol etílico (0,789 g/cm<sup>3</sup>)

g: graduación de bebida alcohólica (% , 0,01 cc)

m: masa de la persona expresada en kilogramos (kg)

r: factor de distribución del individuo:

Varones: 0,68 ± 0,085

Mujeres o varones jóvenes: 0,55 ± 0,055

Lactantes o niños pequeños: 0,75 a 0,80

c: concentración de alcohol en sangre expresada en gramos por litro de sangre (g/l)

\*corrección presencia comida.

alcohol. Es decir, la comida, desde el estómago y durante las 6 – 8 horas que dura la digestión, lo que hace es absorber moléculas de alcohol y las elimina, por lo que parte de la tasa alcohólica calculada no se absorberá al torrente sanguíneo al ser eliminada. La tasa de alcoholemia ascenderá hasta un 0,2 g/l de alcohol etílico en sangre menos.

Con los resultados obtenidos, si se toma el resultado más favorable — la mayor tasa alcohólica—, y se toma la hora de comienzo de ingesta alcohólica las 19:47 h (Caso 1), a las 20:22 h su tasa alcohólica es de 0,218787878 mg/l en aire espirado menos el factor eliminación del etanol del organismo (0,01 mg/l, al ser 30 minutos 0,005 mg/l), se obtienen unas concentraciones de 0,427575757 g/l sangre- 0,213787878 mg/l ae. Según dato de Ministerio de Sanidad, un hígado detoxifica a una velocidad constante y lenta de 0,12 g/l de sangre/h (Ministerio Sanidad, 2024), 0,06 mg/l en aire espirado/h. Además, hay que sumar el factor eliminación del etanol del organismo, total 0,14 g/l de sangre/h, 0,07 mg/l/h.

La primera prueba de alcoholemia realizada a las 20:25 h por agentes de Policía Municipal de Madrid y la detenida arrojó un resultado de 0,28 mg/l en aire espirado. A las 20:37 h se realizó la segunda prueba de alcoholemia y la detenida arrojó un resultado de 0,26 mg/l en aire espirado. Si analizamos la detoxificación con el tiempo, hasta las 21:22 h se produce la fase de meseta con tasa alcohólica ligeramente inferior debido al factor eliminación, obteniendo concentraciones de 0,407575757 g/l sangre, 0,203787878 mg/l ae. A las 22:22 h presenta una tasa alcohólica de 0,267575757 g/l sangre; 0,133787878 mg/l ae. A las 23:22 h presenta una tasa alcohólica de 0,127575757 g/l sangre; 0,063787878 mg/l ae y sobre las 0:22 h el organismo habría terminado de eliminar y detoxificar todo el alcohol ingerido manifestado (figura 4). Tomando los valores máximos de la investigación, para ser más favorables y garantistas, la manifestación espontánea de ingesta alcohólica transcrita en folio Comparecencia con detenida comparada a los valores arrojados en la prueba de alcoholemia no se corresponden. Según manifestación espontánea, la detenida, por tiempos, debería encontrarse en fase de estabilización o meseta en su curva de alcoholemia, y según valores arrojados en prueba alcohólica se encuentra en fase de descenso. Se determina que la manifestación espontánea que aporta la detenida es incierta.

Respecto al Caso 2, se toma la hora de comienzo de ingesta alcohólica las 20:00 h, a las 20:30 h su tasa alcohólica es de 0,310246848 mg/l en



**Figura 4.** Caso 1. Ingesta alcohólica manifestada por conductora y valores arrojados por la misma en prueba de alcoholemia.

aire espirado, hasta las 21:30 h se produce la fase de meseta con igual tasa de alcoholemia, comenzando entonces la detoxificación del alcohol a través del hígado. Estos datos indican que a las 22:30 h presenta una tasa alcohólica de 0,250246848 mg/l en aire espirado. Hora del atropello. A las 23:30 h presenta una tasa alcohólica de 0,190246848 mg/l en aire espirado.

A las 0:30 h presenta una tasa alcohólica de 0,130246848 mg/l en aire espirado. A las 1:30 h presenta una tasa alcohólica de 0,070246848 mg/l en aire espirado. A las 2:30 h presenta una tasa alcohólica de 0,010246848 mg/l en aire espirado. Sobre las 3:00 horas el organismo ha terminado de detoxificar y eliminar todo el alcohol ingerido. Cabe recordar que a las 5:11 h se realizó la primera prueba de alcoholemia por agentes de Policía Municipal de Madrid y el detenido arrojó un resultado de 0,31 mg/l en aire espirado. A las 5:38 h se realizó la segunda prueba de alcoholemia y el detenido arrojó un resultado de 0,24 mg/l en aire espirado (figura 5). Tomando los valores máximos de la investigación, para ser más favorables y garantistas, la manifestación de ingesta alcohólica declarada en folio Diligencia de toma de declaración a detenido comparada a los valores arrojados en la prueba de alcoholemia, se determina que es incierta.



**Figura 5.** Caso 2. Ingesta alcohólica manifestada por conductor y valores arrojados por la misma en prueba de alcoholemia.

## 2. Cálculo de tasa de alcoholemia retrospectiva.

### Caso 1

Se parte de dos pruebas de alcoholemia en aire espirado realizadas por agentes de Policía Municipal de Madrid en un intervalo no inferior a diez minutos. Los resultados obtenidos son: 0,28 mg/l en aire espirado a las 20:25 h y 0,26 mg/l en aire espirado a las 20:37 h, que aplicando el ratio de equivalencia entre las mediciones aire-sangre con el factor de corrección de 2000:1, aceptado en España, corresponde a valores de

0,56 g/l y 0,52 g/l de alcohol etílico en sangre respectivamente. Si se atiende a la declaración aportada por el conductor contrario en las presentes, manifiesta que la detenida, a la hora del accidente, se encontraba bajo los efectos de bebidas alcohólicas, observándole claros signos alcohólicos. Se calcula la tasa de alcoholemia a la hora del accidente tomando por cierta la manifestación espontánea de la detenida que «hace treinta minutos ha tomado dos copas de vino mientras comía».

Atendiendo al fundamento teórico, se define la ingesta alcohólica manifestada por la detenida (figura 3, ingesta alcohólica 4), y el momento de la prueba de alcoholemia realizada por agentes de Policía Municipal de Madrid como el inicio del punto máximo del descenso de la línea, ya que la manifestación corresponde a los 30 minutos de ascenso del etanol ingerido.

Por lo que se rescatan valores anteriormente calculados y se resta la tasa alcohólica máxima, para ser más garantistas, que genera la ingesta alcohólica manifestada por la detenida a 0,06 g/l de sangre cada media hora (restando el factor eliminación del etanol del organismo) obtenemos valores de 0,367575757 g/l, 0,183787878 mg/l ae, ascendería segunda ingesta alcohólica manifestada. Si se resta la tasa máxima de alcoholemia de esta ingesta alcohólica, para ser más beneficiosos para la detenida, a su tasa de alcoholemia menor arrojada, para ser más garantistas se obtiene un valor de 0,076212121 mg/l ae. Esta tasa alcohólica corresponde a las 20:17 horas, hora de localización de la detenida, menos treinta minutos de su manifestación, que corresponden a la casi terminada fase de ascenso en la curva de alcoholemia: 19:47 horas y antes de la ingesta alcohólica manifestada:  $0,076212121 \cdot 2 = 0,152424243$  g/l sangre. Se calcula la tasa de alcoholemia que porta la detenida 257 minutos antes (momento del accidente), ya que el tiempo que se debe calcular oscila de las 15:30 h a las 19:47 h, y se cumplen las cuatro premisas anteriormente descritas (tabla 2).

**Tabla 2:** Tasa de alcoholemia estimada y arrojada en prueba de alcoholemia

Widmark-Dubowski (1980)	$C_0 = C_1 + (\beta \cdot t)$
$C_{0,1} = 0,725534243$ g/l sangre	$C_{0,2} = 0,915714243$ g/l sangre
$C_{0,1} = 0,362767121$ mg/l ae	$C_{0,2} = 0,457857121$ mg/l ae

$C_0$ : tasa de alcoholemia estimada expresada en gramos por litro de sangre (g/l)

$C_1$ : tasa de alcoholemia arrojada en prueba de alcoholemia expresada en gramos por litro de sangre (g/l)

$\beta$ : factor etil-oxidación (Dubowski, 1980):

Varones:  $0,0025 \pm 0,00056$

Mujeres:  $0,0026 \pm 0,00037$

$t$ : tiempo transcurrido desde la hora de los hechos hasta la hora de la prueba de alcoholemia expresado en minutos (min).

nuestra medición se realizó en aparato etilómetro verificado en aire espirado, —de 4.0 % si el etilómetro está en su primer año y no ha sufrido alteración alguna— sobre la tasa de alcohol arrojada por el individuo. Se calcula la tasa de alcoholemia retrospectiva a la hora del accidente descontando, para ser más garantistas, el margen de error que trae el resultado de la prueba de alcoholemia que arrojó la detenida, obteniendo como resultado 0,0195 posible error del aparato etilómetro, con una Tasa alcohólica con margen de error aplicado de 0,2405 mg/l ae. Se resta la tasa máxima de alcoholemia de esta ingesta alcohólica, para ser más beneficiosos para la detenida, a su tasa de alcoholemia menor arrojada, con margen de error aplicado, obteniendo 0,056712122 mg/l ae. Esta tasa alcohólica corresponde a las 20:17 horas, hora de localización de la detenida, a la que se le restan treinta minutos de ascenso en la curva de alcoholemia, correspondiente a las 19:47 horas y antes de la ingesta alcohólica manifestada (figura 4). Por lo tanto, la tasa de alcoholemia que porta la detenida a la hora del accidente, aplicado el margen de error, oscila entre 0,686534244 g/l y 0,876714244 g/l de sangre, entre 0,343267122 mg/l y 0,438357122 mg/l en aire espirado. Por todo lo anterior descrito se concluye que la tasa de alcoholemia mínima que porta la detenida a la hora del accidente es de 0,343267122 mg/l en aire espirado.

Según la tabla de Kurt M. Dubowski (1980) que elaboró tras su estudio etapas de influencia/intoxicación alcohólica aguda, la detenida se encontraría en la etapa de influencia alcohólica: Euforia; y presentaría la siguiente sintomatología etílica: Leve euforia, sociabilidad, locuacidad. Mayor confianza en uno mismo; disminución de las inhibiciones. Disminución de atención, juicio y control. Algún deterioro sensorio-motor. Procesamiento de información lento. Pérdida de eficiencia en pruebas críticas de rendimiento.

Según la tabla de María José Anadón que elaboró tras su estudio Dosis y efectos tóxicos del alcohol etílico, la detenida presentaría la siguiente sintomatología: aparece una pérdida del 15 % de la visión de lejos. Aumenta el tiempo de reacción. Se altera de forma variable la voluntad, memoria y atención.

Según la tabla de DGT (Dirección General de Tráfico) (Orden ICT/155/2020), de signos y síntomas alcohólicos según tasa de alcoholemia, la detenida presentaría el siguiente cuadro de sintomatología etílica: ZONA DE ALARMA: Peor percepción de las distancias. Problemas para adaptar la visión a los cambios de luz (deslumbramientos). Disminución de la sensibilidad de la luz roja. Alteraciones en la toma de decisiones. Falsa sensación de seguridad en sí mismo. Impulsividad y agresividad. Alteraciones motoras y psicomotoras. Mayor número de errores en la trayectoria. Perturbación del equilibrio. Menos sensación de fatiga. Incremento de la somnolencia.

En la Instrucción 3/2006 y Circular 10/2011 de Fiscalía General del Estado, junto con la redacción de María José Anadón, se enuncia que toda tasa alcohólica superior a 0,60 mg/l en aire espirado se trata como objetivada y corroborada la influencia de alcohol en la conducción, punible en todo caso. Y toda tasa alcohólica inferior a 0,60 mg/l en aire espirado, para que constituya el tipo delictivo se tendrá que acreditar la influencia del alcohol en la conducción aportando: la culpabilidad en siniestro vial o infracción grave o muy grave a Ley de Seguridad Vial o conducción anómala junto con una sintomatología alcohólica elevada.

**Caso 2**

Se parte de dos pruebas de alcoholemia en aire espirado realizadas por agentes de Policía Municipal de Madrid en un intervalo no inferior a diez minutos. Los resultados arrojados por el detenido son: 0,31 mg/l en aire espirado a las 05:11 horas y 0,24 mg/l en aire espirado a las 05:38 horas, que aplicando el ratio de equivalencia entre las mediciones aire-sangre con el factor de corrección de 2000:1, aceptado en España, corresponde a valores de 0,62 g/l y 0,48 g/l de alcohol etílico en sangre respectivamente. Se calcula la tasa de alcoholemia que porta el detenido 428 minutos antes (momento del atropello) (tabla 3).



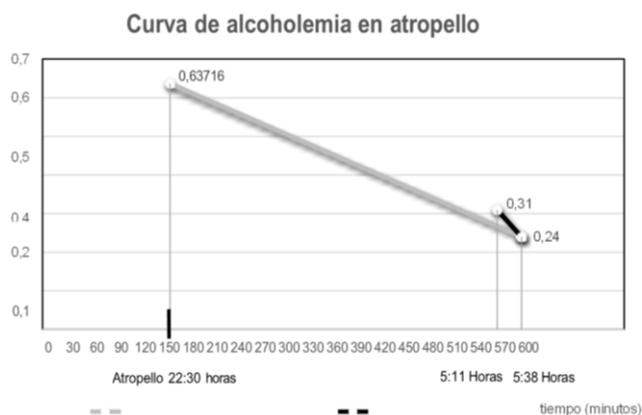
**Figura 6.** Ingesta alcohólica de la conductora.

Si se remite a Informe del Centro Español de Metrología a la Fiscalía de Seguridad Vial sobre cinemómetros y etilómetros evidenciales<sup>17</sup> nos informa de los márgenes de error en etilómetros. Y según la Orden ICT/155/2020, de 7 de febrero (Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, 2023), se deberá aplicar un margen de error de 7.5 %, ya que

Como se ha descrito anteriormente, si se remite a Informe del Centro Español de Metrología a la Fiscalía de Seguridad Vial sobre cinemómetros y etilómetros evidenciales<sup>17</sup> nos informa de los márgenes de error en etilómetros. Y según la Orden ICT/155/2020, de 7 de febrero<sup>18</sup>, se deberá aplicar un margen de error de 7.5 %, sobre la tasa de alcohol arrojada por el individuo. Se calcula la tasa de alcoholemia retrospectiva a la hora del atropello descontando, para ser más garantistas, el margen de error del resultado de la prueba de alcoholemia practicada al detenido, obteniendo como resultado 0,018 posible error del aparato etilómetro, con una Tasa alcohólica con margen de error aplicado de 0,222 mg/l ae, que corresponde a 0,444 g/l sangre. Por lo tanto, la tasa de alcoholemia que porta el detenido a la hora del atropello, aplicado el margen de error, oscila entre 1,27432 g/l y 1,75368 g/l de sangre, entre 0,63716 mg/l y 0,87684 mg/l en aire espirado. Por todo lo anterior descrito se concluye que la tasa de alcoholemia mínima que porta el detenido a la hora del atropello es de 0,63716 mg/l en aire espirado (tabla 3).

**Tabla 3:** Tasa de alcoholemia estimada y arrojada en prueba de alcoholemia

Widmark-Dubowski (1980)	$C_0 = C_1 + (\beta \cdot t)$
$C_{0,1} = 1,27432$ g/l sangre	$C_{0,2} = 1,75368$ g/l sangre
$C_{0,1} = 0,63716$ mg/l ae	$C_{0,2} = 0,87684$ mg/l ae



**Figura 7.** Tasa de alcoholemia del conductor a la hora del atropello.

Según la tabla de Kurt M. Dubowski, respecto al estudio de las etapas de influencia/intoxicación alcohólica aguda, el detenido se encontraría en: etapa de influencia alcohólica: Excitación; y presentaría la siguiente sintomatología etílica: Inestabilidad emocional, pérdida de juicio crítico. Deterioro de la percepción, la memoria y la comprensión. Disminución de la respuesta sensitiva; mayor tiempo de reacción. Reducción de la agudeza visual y la visión periférica; y lenta recuperación del deslumbramiento. Incoordinación sensorio-motora; equilibrio deteriorado; dificultad para hablar; vómitos; somnolencia. Según la tabla de Anadón (2022), el detenido presentaría la siguiente sintomatología: embriaguez ligera general y el individuo habla mal, farfullando. Se pierde un 70 % de la visión de lejos y aparecen vértigos.

Según la tabla de Dirección General de Tráfico (DGT) (Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, 2023), de signos y síntomas alcohólicos según tasa de alcoholemia, el detenido presentaría el siguiente cuadro de sintomatología etílica: conducción peligrosa: Graves problemas perceptivos (visión doble, deslumbramientos, visión en túnel, etc). Graves alteraciones atencionales (especialmente la vigilancia y la atención dividida). Graves alteraciones en la toma de decisiones. Peor percepción y mayor tolerancia al riesgo. Sobrestimación de las propias capacidades. Comportamiento impulsivo impredecible. Grave alteración del tiempo de reacción. Problemas serios de la coordinación y la percepción de los movimientos.

1. Orden ICT/155/2020

## Conclusiones

En el primero de los casos estudiados, se concluye que la detenida es presunta autora de un delito contra la seguridad vial, conducir vehículo a motor bajo la influencia de bebidas alcohólicas y, en consecuencia, el delito de lesiones graves por imprudencia menos grave se agrava a delito de lesiones graves por imprudencia grave.

Respecto al segundo caso estudiado, el detenido es presunto autor de un delito contra la seguridad vial, conducir vehículo a motor bajo la influencia de bebidas alcohólicas y, en consecuencia, el delito de lesiones graves por imprudencia menos grave se agrava a delito de lesiones graves por imprudencia grave.

Se recuerda que ambos detenidos también fueron investigados como presuntos autores de un delito de abandono del lugar del accidente.

## Referencias bibliográficas

1. Ley Orgánica 2/1986, de 13 de marzo, de Fuerzas y Cuerpos de Seguridad. BOE núm. 63 (14/03/1986). Referencia BOE-A-1986-6859. Artículo 53. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/lo/1986/03/13/2/con>
2. Ley 1/2018, de 22 de febrero, de Coordinación de Policías Locales de la Comunidad de Madrid. BOE núm. 137 (06/06/2018). Referencia BOE-A-2018-7516. Artículo 11 apartado c. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/esmd/l/2018/02/22/1/con>
3. Real Decreto de 14 de septiembre de 1882 por el que se aprueba la Ley de Enjuiciamiento Criminal. Ministerio de Gracia y Justicia. Gaceta de Madrid núm. 260 (17 septiembre de 1982). Artículo 457. Disponible en: [https://www.boe.es/eli/es/rd/1882/09/14/\(1\)/con](https://www.boe.es/eli/es/rd/1882/09/14/(1)/con)
4. Ley Orgánica 5/2010, de 22 de junio, por la que se modifica la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. Jefatura del Estado. BOE núm. 152 (23 de junio de 2010). Artículo 796.1.ª. Referencia BOE-A-2010-9953. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/lo/2010/06/22/5>
5. De Pablo, J. (2022). *El informe 'De Pablo'*. España. Editorial Círculo Rojo.
6. Anadón, M.J., Muñoz A. y Benito M. (2022). *Manual para el estudio de las Ciencias Forenses*. España. Editorial Tébar Flores.
7. mscbs.gob.es [Internet]. Madrid: Ministerio de sanidad [22 de enero de 2024]. Disponible en: <https://estilosdevidasaludable.sanidad.gob.es/consumo/falsosMitos/trucos/home.htm>
8. Real Decreto 2282/1998, de 23 de octubre, por el que se modifican los artículos 20 y 23 del Reglamento General de Circulación, aprobado por Real Decreto 13/1992, de 17 de enero Real Decreto 2282/1998, de 23 de octubre, por el que se modifican los artículos 20 y 23 del Reglamento General de Circulación, aprobado por Real Decreto 13/1992, de 17 de enero.
9. De Pablo, J. y Moraleda, A. (2024). *DriveGuard*. España. Google Play Store.
10. Real Decreto Legislativo 6/2015, de 30 de octubre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley sobre Tráfico, Circulación de Vehículos a Motor y Seguridad Vial. Ministerio del Interior. BOE 261 (31 de octubre 2015). Artículo 14.
11. Real Decreto 1428/2003, de 21 de noviembre, por el que se aprueba el Reglamento General de Circulación para la aplicación y desarrollo del texto articulado de la Ley sobre tráfico, circulación de vehículos a motor y seguridad vial, aprobado por el Real Decreto Legislativo 339/1990, de 2 de marzo. Ministerio de la Presidencia. BOE núm. 306 (23 de diciembre de 2003). Artículo 23. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/11/21/1428/con>
12. Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal.

Jefatura del Estado. BOE núm. 281 (24 de noviembre de 1995). Referencia BOE-A-1995-25444. Artículos 142, 147, 149, 150, 152, 379.2 y 382 bis. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/lo/1995/11/23/10/con>

13. Real Decreto 2282/1998, de 23 de octubre, por el que se modifican los artículos 20 y 23 del Reglamento General de Circulación, aprobado por Real Decreto 13/1992, de 17 de enero Real Decreto 2282/1998, de 23 de octubre, por el que se modifican los artículos 20 y 23 del Reglamento General de Circulación, aprobado por Real Decreto 13/1992, de 17 de enero.
14. Laboratorio de Toxicología del Instituto Legal de Valencia (31 enero 2014). *Repercusión clínica y jurídica de la ingesta de alcohol etílico. Resolución de casos prácticos.*
15. dgt.es [Internet]. Madrid: Dirección General de Tráfico [7 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.dgt.es/muevete-con-seguridad/evita-conductas-de-riesgo/consumo-de-alcohol/>
16. Dubowski, K.M. Alcohol Determination in the Clinical Laboratory. American Journal of Clinical Pathology [Internet]. 1980 [cited 2021 september]; 74(5):747-50. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcp/74.5.747>
17. Ministerio de Industria, Comercio y Turismo (2023). *Informe del Centro Español de Metrología a la Fiscalía de Seguridad Vial sobre Cinemómetros y Etilómetros Evidenciales.* Disponible en: [https://www.cem.es/sites/default/files/2023-09/INF\\_TECNICO\\_FOTOS\\_CINEM%3%93METROS\\_1.pdf](https://www.cem.es/sites/default/files/2023-09/INF_TECNICO_FOTOS_CINEM%3%93METROS_1.pdf)
18. Orden ICT/155/2020, de 7 de febrero, por la que se regula el control metrológico del Estado de determinados instrumentos de medida. Ministerio de Industria, Comercio y Turismo. BOE núm. 47 (24 de febrero de 2020). Referencia BOE-A-2020-2573. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/o/2020/02/07/ict155>
19. dgt.es [Internet]. Madrid: Dirección General de Tráfico [21 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.dgt.es/muevete-con-seguridad/evita-conductas-de-riesgo/consumo-de-alcohol/>
20. Instrucción 3/2006, de 3 de julio, sobre criterios de actuación del Ministerio Fiscal para una efectiva persecución de los ilícitos penales relacionados con la circulación de vehículos de motor. Fiscalía General del Estado. Referencia FIS-I-2006-00003. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?coleccion=fiscalia&id=FIS-I-2006-00003>
21. Circular 10/2011, de 17 de noviembre, sobre criterios para la unidad de actuación especializada del Ministerio Fiscal en materia de Seguridad Vial. Fiscalía General del Estado. Referencia FIS-C-2011-00010. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=FIS-C-2011-00010>

# Effect of silicic acid and alcoholic beer intake on the excretion of chromium and vanadium and their deposition in the brains of mice chronically exposed to aluminium nitrate.

Peña-Fernández A.<sup>1,2\*</sup>, Angulo S.<sup>3</sup>, González-Muñoz M.J.<sup>4</sup>, Peña M. Á.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28805 Alcalá de Henares, Spain.

<sup>2</sup> Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK.

<sup>3</sup> Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities, Urbanización Montepríncipe, 28660 Boadilla del Monte, Spain.

<sup>4</sup> Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

**Abstract:** The effect of aluminium (Al) exposure and silicon (Si) intake on the levels of chromium (Cr) and vanadium (V) in mouse brains was studied. Six-week-old male NMRI mice were divided into four groups. Three groups received Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> at a dose of 450 µg/ml for three months; meanwhile, the fourth group only received deionised water. The first group received aluminium nitrate (Al group); the second group aluminium nitrate and silicic acid (50 mg/ml); and the third group aluminium nitrate and commercial beer. Metals were monitored by ICP-OES in the right hemibrain, faeces, urine and blood. V was only detected in the faecal samples, being significantly higher in the Al group (4.132 vs. 3.383, 3.100 and 3.315; groups 4, 2 and 3, respectively; all in µg/g; *p*-value=0.038). Conversely, lower and significantly lower levels of Cr were detected in the faeces (2.867 vs. 3.155, 2.270 and 2.550 µg/g; *p*-value=0.296) and blood (0.187 vs. 0.158, 0.197 and 0.211 µg/l; *p*-value=0.013) in the Al group, respectively, as well as in the urine (0.00047 vs. 0.00069, 0.00060, 0.00065 µg/µmol creatinine; *p*-value=0.311), suggesting a potential effect of Al intoxication on the metabolism of Cr. These unknown effects might explain the lower levels of Cr that were detected in the intoxicated animals' brains (0.346 µg/g). Thus, the intoxicated animals that were provided with Si showed Cr brain levels slightly higher than those in the Al group (0.360 and 0.352 vs. 0.346 µg/g; *p*-value=0.552). The consumption of beer/silicic acid appears to partially block the negative effects of aluminium ingestion on the normal metabolism of chromium.

**Keywords:** Chromium, vanadium, aluminium intoxication, silicon, brain accumulation.

## Introduction

The number of individuals with Alzheimer's disease (AD) is predicted to worsen with the increasing life expectancy. Environmental risk factors, including chronic exposure to different metals, can play a key role in accelerating or decelerating the onset and progression of AD. *Neurometals*, which include copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn) and zinc (Zn), are distributed in different regions of the brain, playing important roles such as myelination, neurotransmitter synthesis, memory formation, and protection of brain cells [1]. Humans will be more likely to be exposed to toxic/carcinogenic metals in urban ecosystems due to the increasing levels of contamination in these environments and the increasing human trend to live in cities. These chronic exposures can affect the homeostasis of essential minerals, impacting normal brain physiology, disturbances that could play a role in the accumulation of extracellular amyloid-β (Aβ) plaques and intracellular tau-containing neurofibrillary tangles in the brain [2,3]. Thus, exposure to aluminium (Al) has been linked with AD as this element enhances the production and aggregation of Aβ while preventing its degradation [2]. However, human exposure to Al in modern society is inevitable and burgeoning, due to its anthropogenic uses [4].

Our group has observed that silicon (Si), consumed in the form of silicic acid or through beer, significantly normalised the levels of Cu, Mn and Zn in brain tissue in mice chronically exposed to Al (three

month; [5]). We also previously observed that providing Si in the form of silicic acid may lower the bioavailability of Al in intoxicated mice, and reduce the concentrations of Al in the blood and brain tissue of these animals [6,7]. The aim of this study was to evaluate the potential effect of Al exposure and Si intake on the levels of chromium (Cr; as an essential mineral) and vanadium (V; as a toxic element) in mouse brain.

## Materials and methods

Six-week-old male NMRI mice (Animal Research Centre, University of Alcalá; homologated by the Spanish Competent Authority, Register Number ES280050001165 implementing the Spanish Royal Decree 53/2013 and the European Directive 63/2010/EU for protecting animals in research) weighing approximately 30 g each were randomly divided into four groups (n=12). Three groups received aluminium nitrate [Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O] (Aldrich, CAS 7784-27-2), at a dose of 450 µg/ml dissolved in the drinking water, for three months, meanwhile the fourth group only received deionised water (negative control). This concentration was selected as previously used by Colomina et al. [8] in rats. The first group received only aluminium nitrate (Al group); the second group (Al + silicic acid group) received aluminium nitrate and a solution of silicic acid [50 mg/ml; Si(OH)<sub>4</sub> (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland)]; and the third group (Al + beer group) received aluminium nitrate and an amount of commercial beer (containing 5.5% alcohol) equivalent to moderate to high consumption in humans (equivalent to 1 l/day; [6]). These solutions were prepared daily throughout the study and the content of Al was measured in each batch. The concentration of the silicic acid solution provided was approximately twice the content of Si determined in the commercial beer used, specifically selected to study the influence of the Si concentration on the metabolism of Al [6,7], and on different essential and toxic elements. The protocol employed in this experiment was approved by the Ethics Committee of the Universidad de Alcalá (Madrid, Spain) [5].

After three months, the mice were transferred to individual plastic metabolic cages and urine and faeces were collected (24 h) for elemental analysis. Animals were then sacrificed by piercing the heart under halothane anaesthesia, and blood and brain tissue samples were collected for subsequent analysis. Approximately 2 ml of blood was collected per mouse and stored in heparinised polyethylene tubes. Each brain was equally divided into two parts. The whole right hemibrain was used for mineral content, while the left hemibrain was kept in formaldehyde for other studies/analyses.

Cr and V were monitored by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES; Perkin Elmer Optima model 3200 RL, Boston, MA, USA) following mineralisation with 4 ml 65% HNO<sub>3</sub>/1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as previously described [5], in the right hemibrain and in faeces, urine and blood, which were appropriately collected at the end of the three months of treatment. Additionally, the content of these two metals was monitored in the commercialised beer used, which is discussed in more depth in Peña-Fernández et al. [9]. Briefly: one ml of alcoholic beer from five different bottles were mineralised following the same methods used to prepare the animal tissue samples; Cr and V were monitored following same procedures and equipment. The content of these two metals in beer is only provided for information/discussion.

\*e-mail: antonio.penafer@uah.es

The accuracy of the instrumental methods was validated by replicating all samples as well as by taking measurements of reference material (lobster hepatopancreas, NRC Canada TORT 2) every 10 samples. Quantification was based on the most abundant isotope of each element free of analytical interferences. The mean recovery rates were around 90%. More details on validation criteria have been previously reported [5-7].

Creatinine was also determined in urine samples using the commercial kit Applied Clinical Chemistry (QCA SA.), which is based on the modified Jaffe method, as described in González-Muñoz et al. [10]. Concentrations were measured using a Perkin Elmer UV/VIS Spectrophotometer (model lambda 12).

Results are reported as means  $\pm$  SD; all analyses were performed in triplicate. Significance scores were based on Kruskal-Wallis with post-hoc Dunn's test (KS-Dunn's) for nonparametric multiple comparisons (SPSS version 27, IBM SPSS Statistics). For cumulative frequency distribution, Kolmogorov-Smirnov test was used. Differences were considered statistically significant at  $p$ -value lower than 0.05.

## Results and discussion

The concentrations of Cr and V in the beer samples are shown in Table 1; the limits of detection (LoDs) of these two elements in the beer samples (0.004 and 0.041  $\mu\text{g/ml}$ , respectively) are also provided (data has been collected from Peña-Fernández et al. [9]). Only beer glass samples were monitored, as the containers could lead to the migration of elements into the brewed product. The concentrations were in line with those reported in the literature [11,12], being slightly lower but within the same ranges as those reported in beer with alcohol from Granada, Spain [12]. The estimated daily dietary intake (DDI) of Cr was 3.036  $\mu\text{g/person}$ , which was calculated by multiplying the concentration by the reported daily consumption of alcoholic beer in Spain (149 ml/person) [12]. The DDI for Cr covers an 8.7% of the established recommended dietary allowance (RDA) for this element for men (35  $\mu\text{g day}^{-1} \text{ person}^{-1}$ ), which would be even lower because only a small proportion of the Cr ingested with alcoholic beverages is absorbed and converted into a biologically active form [12]. For its part, the intake of V from alcoholic beer would not pose a significant risk as a daily intake of 10-100  $\mu\text{g/day}$  from food sources has been considered as safe [13]. The content of Cr and V in the beer samples was too low to have a significant effect on the metabolism of these elements in this study, although future studies should consider the use of different commercial beers, with and without alcohol, as the element content in beer can be influenced by different factors, including the beer style or the geographical origin of the grains [14].

**Table 1.** Concentrations of metals ( $\mu\text{g/ml}$ ) in alcoholic beer from Madrid Region, Spain. Data extracted from Peña-Fernández et al. [9].

Element	LoD	P25	P50	P75	A.M.	Range
Cr	0.004	0.0165	0.0224	0.0232	0.0204 $\pm$ 0.0016	0.0161-0.0238
V	0.041	0.0438	0.0473	0.0502	0.0471 $\pm$ 0.0018	0.0437-0.0502

LoD = limit of detection; P25, P50, P75 = percentiles; A.M. = arithmetic mean (results are presented as mean values  $\pm$  S.D.).

Vanadium was only detected in the faecal samples (LoD = 0.01  $\mu\text{g/g}$ ) as reported in Table 2, being significantly higher in the Al group (4.132 vs. 3.383, 3.100 and 3.315; for groups 4, 2 and 3, respectively; all in  $\mu\text{g/g}$ ;  $p$ -value=0.038). This result would be logical owing to the bioavailability of this element. Thus, it has been estimated that less than 5% of ingested V is absorbed in the gastrointestinal tract, and no more than 1% of V contained in the diet is absorbed [15].

For its part, total Cr was detected in all type of samples (LoD = 0.004  $\mu\text{g/g}$ ; Table 2). Conversely to the absorption, distribution and excretion observed for V, lower levels of Cr were detected in the faeces (2.867 vs. 3.155, 2.550 and 2.270; data is presented as mean averages  $\pm$  standard deviations, all in  $\mu\text{g/g}$ ; Table 2) and blood (0.187 vs. 0.158,

0.211 and 0.197; all in  $\mu\text{g/l}$ ;  $p$ -value=0.013) in the Al group, and also

were lower in urine in this intoxicated group (0.00047 vs. 0.00069, 0.00065 and 0.00060; all in  $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  creatinine). However, none of these differences observed for chromium were statistically different except for its presence in blood; although the trend observed might become significant with more animals/replicates for each intoxicated and control group. Previous human biomonitoring studies have reported a lower presence of Cr in serum of individuals chronically exposed to moderated concentrations of Al and other toxic elements such as thallium and uranium [16]. It is generally accepted that Al, even at low doses, can be strong competitors of micronutrients in metabolic processes [16].

**Table 2.** Chromium and vanadium concentrations in faeces ( $\mu\text{g/g}$ ), blood ( $\mu\text{g/l}$ ) and urine ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$  creatinine) of mice from the different experimental groups: control, treated with aluminium nitrate (*Aluminium*), aluminium nitrate together with beer (*Al + beer*), and aluminium nitrate together with silicic acid (*Al + silicic acid*).

	Faeces		Blood		Urine	
	Cr	V	Cr	V	Cr	V
<b>Control</b>	3.155 $\pm$ 2.184	3.383 <sup>a</sup> $\pm$ 0.831	0.158 <sup>a</sup> $\pm$ 0.017	/	0.00069 $\pm$ 0.00031	/
<b>Aluminium</b>	2.867 $\pm$ 0.602	4.132 <sup>b</sup> $\pm$ 0.693	0.187 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0.049	/	0.00047 $\pm$ 0.00018	/
<b>Al + beer</b>	2.550 $\pm$ 0.913	3.315 <sup>b</sup> $\pm$ 0.894	0.211 <sup>b</sup> $\pm$ 0.053	/	0.00065 $\pm$ 0.00023	/
<b>Al + silicic acid</b>	2.270 $\pm$ 0.775	3.100 <sup>b</sup> $\pm$ 1.218	0.197 <sup>b</sup> $\pm$ 0.037	/	0.00060 $\pm$ 0.00025	/
<b>KS-Dunn's</b>	0.296	0.038	0.013	/	0.311	/

Values are mean  $\pm$  SD of 12 samples. Different letters in the same column indicate significantly different values ( $p < 0.05$ ). / = data below the LoD.

The role of essential elements in neurobiological processes is a topic of growing interest. They are involved in many essential activities and their deficiency can be lethal. However, information on the possible effect of Al intoxication on Cr metabolism is scarce in the literature. In addition, few studies have reported on the levels of Cr and V in the brains of patients with neurodegenerative diseases and healthy individuals. Thus, although our results could indicate a possible effect of Al intoxication on the metabolism of Cr, finding a hypothesis that could explain it is a real challenge due to the lack of information available in the literature. These unknown effects could explain the lower levels of Cr also found in the brains of intoxicated animals (0.346  $\mu\text{g/g}$ ). Thus, intoxicated animals that received Si had similar brain Cr levels to non-intoxicated animals (0.360 and 0.352 vs. 0.395  $\mu\text{g/g}$ ) (Table 3), although our results did not show statistical differences. Previous studies have not found statistically differences when comparing the concentration of Cr in brain tissue (hippocampus and cerebral cortex) in deceased patients diagnosed with Alzheimer's disease (AD) with age-matched control individuals from Eastern Canada and the United Kingdom [17]. The potential antagonistic effect of Al with the absorption and metabolism of Cr should be further explored because of the relevance of this essential micronutrient on human health. Thus, the intake of bioavailable chromium has been related with an improvement of memory, a reduction in neuroinflammation and a potential to reverse neuropathological processes in patients with AD [18].

The lack of detection of V in the monitored brain tissue ( $< 0.01 \mu\text{g/g}$  fresh wet weight in all the groups; Table 3) might be attributed to the generally low presence of this metal in brain tissue reported in the literature. For example, Ward and Mason [17] have found low concentrations of V in hippocampal and cerebral cortex tissue samples monitored post-mortem in patients diagnosed with AD and with age-matched controls (0.978 and 0.0141, 0.0352 and 0.0308, respectively, all in  $\mu\text{g/g}$  dry weight). Further studies should also consider monitoring different regions of the brain to further understand the potential role of trace elements in the pathogenesis of aluminium intoxication and the development of neurodegenerative diseases. The identification of appropriate wet-to-dry mass ratios will also allow for proper

comparison with reference data from other studies, as discussed by Krebs et al. [19], due to the water content of brain tissue. Thus, these authors have reported wet-to-dry mass ratios that differed slightly between cortical grey matter (5.84-6.40) and white matter regions (2.95-3.05), which contain less water.

**Table 3.** Brain chromium and vanadium concentrations ( $\mu\text{g/g}$  fresh wet weight) of mice from the different experimental groups: *control*, treated with aluminium nitrate (*Aluminium*), aluminium nitrate together with beer (*Al + beer*), and aluminium nitrate together with silicic acid (*Al + silicic acid*)

	Brains	
	Cr	V
<b>Control</b>	0.395 $\pm$ 0.153	/
<b>Aluminium</b>	0.346 $\pm$ 0.062	/
<b>Al + beer</b>	0.352 $\pm$ 0.112	/
<b>Al + silicic acid</b>	0.360 $\pm$ 0.066	/
<b>KS-Dunn's</b>	0.552	/

Values are mean  $\pm$  SD of 12 samples. / = data below the LoD/data not applicable.

## Conclusions

Although our results should be considered as preliminary as there is a hypothesis that could explain the interaction between aluminium and silicon with chromium and/or vanadium, consumption of beer and silicic acid appears to partially block the negative effects of aluminium ingestion on the normal metabolism of chromium. Conversely, aluminium might not affect absorption or accumulation of vanadium. Further studies would be needed to investigate the potential interaction of Al in the absorption/excretion of V as this toxic metal can also induce neurotoxicity.

**Author Contributions:** Conceptualisation, APF; methodology, APF, SA, MGM, MAP; validation, APF; formal analysis, APF, SA; investigation, APF, SA, MGM, MAP; resources, APF, MGM and MAP; data curation, APF and SA; writing—original draft preparation, APF; writing—review and editing, APF, SA, MGM, MAP; visualisation, APF, SA, MGM, MAP; supervision, APF and MGM; project administration, APF, MGM and MAP; internal funding acquisition, APF and MGM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the Asociación de Cerveceros Españoles, project XF20 (29,828.58 euros), Spain.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to further processing for a future submission as a manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Kawahara, M.; Kato-Negishi, M.; Tanaka, K.-i. Dietary Trace Elements and the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Nutrients* 2023, 15, 2067. <https://doi.org/10.3390/nu15092067>
- Huat, T. J., Camats-Perna, J., Newcombe, E. A., Valmas, N., Kitazawa, M., & Medeiros, R. (2019). Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *Journal of molecular biology*, 431(9), 1843–1868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.018>
- Busche, M.A., Hyman, B.T. Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 23, 1183–1193 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0687-6>
- Bryliński, Ł.; Kostelecka, K.; Woliński, F.; Duda, P.; Góra, J.; Granat, M.; Flieger, J.; Teresiński, G.; Buszewicz, G.; Sitarz, R.; et al. Aluminium in the Human Brain: Routes of Penetration, Toxicity, and Resulting Complications. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7228. <https://doi.org/10.3390/ijms24087228>
- González-Muñoz, M. J., Garcimartán, A., Meseguer, I., Mateos-Vega, C. J., Orellana, J. M., Peña-Fernández, A., ... & Sanchez-Muniz, F. J. (2017). Silicic acid and beer consumption reverses the metal imbalance and the prooxidant status induced by aluminum nitrate in mouse brain. *Journal of Alzheimer's Disease*, 56(3), 917–927. DOI: 10.3233/JAD-160972
- Peña, A., Meseguer, I., & González-Muñoz, M. J. (2007). Influence of moderate beer consumption on aluminium toxicokinetics: Acute study. *Nutricion Hospitalaria*, 22(3), 371–376.
- González-Muñoz, M. J., Peña, A., & Meseguer, I. (2008). Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.036>
- Colomina, M. T., Roig, J. L., Sánchez, D. J., & Domingo, J. L. (2002). Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology*, 23(6), 775–781. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(02\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(02)00008-6)
- Peña-Fernández, A., González-Muñoz, M. J., Young, C.N., Evans, M.D., Lobo-Bedmar M. C., & Peña, M. (2025). Essential mineral content and vanadium in a popular Spanish brand of alcoholic and non-alcoholic beer, in *Engineering Proceedings*, MDPI: Basel, Switzerland, *submitted for publication*.
- González-Muñoz, M.J., Meseguer, I., Peña, A. Beer as a dietary source of silicon and its protective effect against aluminium poisoning: influence on uptake and accumulation of this neurotoxic metal. *Centro de Información Cerveza y Salud* 2006. M-6601-2006.
- Pferdmenges, L.E., Schröter, A., Lohmayer, R., Striegel, L., Rychlik, M., Müller, A., Meinhardt, A.K., Trierweiler, B., Hartmann, B.M. and Frommherz, L. Characterization of the nutrient composition of German beer styles for the German nutrient database. *J. Food Compos. Anal.* 2022 105, 104181. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104181>
- Navarro-Alarcon, M., Velasco, C., Jodral, A. et al. Copper, zinc, calcium and magnesium content of alcoholic beverages and by-products from Spain: nutritional supply. *Food Addit. Contam.* 2007, 24, 685–694. <https://doi.org/10.1080/02652030601185063>
- Harland, B. F., & Harden-Williams, B. A. (1994). Is vanadium of human nutritional importance yet?. *Journal of the American Dietetic Association*, 94(8), 891–894.
- Rodrigo, S., Young, S.D., Talaverano, M.I., Broadley, M.R. The influence of style and origin on mineral composition of beers retailing in the UK. *Eur. Food Res. Technol.* 2017, 243, 931–939. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2805-y>
- Treviño, S., Díaz, A., Sánchez-Lara, E., Sanchez-Gaytan, B. L., Perez-Aguilar, J. M., & González-Vergara, E. Vanadium in biological action: chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. *Biological trace element research* 2019, 188, 68–98. DOI: 10.1007/s12011-018-1540-6.
- Zeneli, L., Sekovanić, A., & Daci, N. (2015). Chronic exposure to aluminum, nickel, thallium and uranium and their relationship with essential elements in human whole blood and blood serum. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(6), 540–546.
- Ward, N. I., & Mason, J. A. (1987). Neutron activation analysis techniques for identifying elemental status in Alzheimer's disease. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 113(2), 515–526.
- Tyczyńska M, Gędek M, Brachet A, Stręk W, Flieger J, Teresiński G, Baj J. Trace Elements in Alzheimer's Disease and Dementia: The Current State of Knowledge. *Journal of Clinical Medicine*.

18. Krebs, N., Langkammer, C., Goessler, W., Ropele, S., Fazekas, F., Yen, K., & Scheurer, E. (2014). Assessment of trace elements in human brain using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(1), 1-7.

# Síndrome anticolinérgico en adulto mayor por *Brugmansia arborea* aplicada en medicina tradicional: reporte de caso

Zertuche Lopez K\*, Aquino Pérez RA., Calvo Aguilar O

Servicio de Urgencias Hospital General Dr. Aurelio Valdivieso SSO, México.

**Resumen:** El síndrome anticolinérgico es una complicación frecuente en personas mayores de 75 años, dado que son los mayores consumidores de fármacos. En la mayoría de casos obedece a sobredosis. En el presente trabajo se presenta el caso de una mujer de 76 años de edad que ingresa por síndrome confusional agudo, tras ingesta de infusión de planta del género *Brugmansia arborea*, empleada como método terapéutico de la medicina tradicional mexicana. Cursa con cuadro clínico de síndrome anticolinérgico caracterizado por midriasis, taquicardia, hipertensión, delirium, sequedad de mucosa y fiebre que se instala después de 2 h desde el consumo de la infusión. Se utilizan benzodicepinas para el control del estado de agitación, pero al persistir la sintomatología se indica neostigmina, con mejoría del cuadro que revierte completamente a las 48 h, sin repercusión neurológica y sin ingreso a UCI.

**Palabras clave.** Intoxicación; síndrome anticolinérgico; Brugmansea; Medicina tradicional.

**Abstract:** *Anticholinergic syndrome in the elderly by Brugmansia arborea applied in traditional medicine: case report.*

Anticholinergic syndrome is a frequent complication in people over 75 years of age, as they are the main consumers of drugs. In most cases it is due to overdose. This paper presents the case of a 76-year-old woman admitted for acute confusional syndrome after ingestion of an infusion of *Brugmansia arborea*, a plant of the genus *Brugmansia arborea*, used as a therapeutic method in traditional Mexican medicine. The patient presented with a clinical picture of anticholinergic syndrome characterised by mydriasis, tachycardia, hypertension, delirium, dryness of mucous membranes and fever, which set in 2 hours after the infusion. Benzodiazepines were used to control the state of agitation, but when the symptoms persisted, neostigmine was indicated, with improvement of the symptoms that completely reversed after 48 h, without neurological repercussions and without admission to the ICU.

**Key words.** Intoxicación; Anticholinergic syndrome; Brugmansea; Traditional medicine.

## Introducción

El síndrome anticolinérgico es una de las intoxicaciones intencionadas o accidentales más frecuente en los servicios de urgencias. La variedad de agentes causales representa un reto en el momento de realizar anamnesis y, dado que los adultos mayores son los principales consumidores per cápita de fármacos (especialmente por enfermedad de Parkinson y depresión), se convierten en un grupo de riesgo (Bautista-Oropesiano et al, 2023). Recientemente, en países de Sudamérica y Europa se han reportados casos de síndrome anticolinérgico con sumisión química o con fines recreativos, involucrando a personas jóvenes (Elena-González et al, 2020).

Actualmente, el síndrome anticolinérgico obedece a intoxicación reportada principalmente en personas mayores de 75 años por acumulación de fármacos, destacando la dificultad diagnóstica de los agentes empleados que, unido a la corta vida media de los mismos, supone un reto en la práctica habitual de los Servicios de Urgencias (Bautista-Oropesiano et al, 2023).

En México se han reportado casos por síndrome anticolinérgico debido a intoxicación farmacológica en intento de suicidio, pero no existen reportes de intoxicación por otro tipo de actividades recreativas o terapéuticas (Carrillo-Esper et al, 2012). El síndrome anticolinérgico

ocasionado por plantas está relacionado con la escopolamina en la medicina tradicional, indicada en el tratamiento de algunas entidades como caries, fiebre, mialgia, otitis, fracturas, enfermedades respiratorias y otras, dado que se le atribuyen acciones antiinflamatoria, antiespasmódica, antiastmática, narcótica y antinociceptiva (Carrillo-Esper et al, 2012). Se encuentra catalogada en el apartado de plantas peligrosas que no pueden usarse como o en productos alimenticios, variando el grado de toxicidad con la estación del año, la etapa de maduración de la planta y el estado de hidratación de la persona, y aunque si bien las semillas son la principal fuente de escopolamina, toda la planta presenta toxicidad en mayor o menor grado (Instituto de Salud Pública de Chile, 2024).

El presente trabajo muestra caso clínico de intoxicación tras ingesta de infusión de planta del género *Brugmansia arborea*, empleada como método terapéutico de la medicina tradicional mexicana.

## Caso clínico

Mujer de 76 años llevada por sus familiares al departamento de urgencias por síndrome confusional agudo, antecedente de hipertensión arterial sistémica diagnosticada durante hospitalización 7 años atrás por bronconeumonía. Tres días antes del ingreso cursa con cuadro gripal, al que se agrega tos con escasa expectoración, ante tal situación decide preparar una infusión a base de una flor reconocida con el nombre de floripondio (5 flores) (*Brugmansia arborea*), de la cual consumió aproximadamente 5 ml. A los 2 minutos presenta debilidad en miembros pélvicos y pérdida del estado de alerta, por lo que acude a valoración a unidad de primer nivel, donde detectan hipertensión arterial TA 153/73 mmHg, y por antecedente de hipertensión deciden envío a urgencias sospechando en un probable accidente cerebro vascular.

A su llegada la evaluación primaria en triage se identifica con vía aérea permeable, sin secreciones, sin requerir oxígeno suplementario satura en parámetros normales, se documenta la crisis hipertensiva y taquicardia, neurológicamente indiferente al medio, con movimientos involuntarios, fiebre, rubicunda y mucosas deshidratadas. En la tabla 1 se muestran las constantes vitales en su ingreso a urgencias hospitalarias.

En la evaluación secundaria a los 30 min persiste neurológicamente indiferente al medio, y la exploración revela pupilas midriáticas y sin reflejos, presencia de arco senil, mucosas deshidratadas, tegumentos con rubicundez, cuello sin adenopatías, tórax con dinámica respiratoria conservada, claro pulmonar, precordio taquicárdico sin agregados, abdomen globoso por páncreo adiposo, peristalsis disminuida, no dolor a la palpación profunda, sin datos de irritación peritoneal, extremidades torácicas y pélvicas integras hipotróficas con fuerza muscular conservada llenado capilar de 2 segundos y reflejos osteotendinosos aumentados (figura 1).

El reporte de los estudios de laboratorio muestra alteración en gasometría arterial con acidosis metabólica a expensas de pH 7.49, PCO<sub>2</sub>, 25 mmHg, PO<sub>2</sub>, 57 mmHg, Lactato 1.6 mmol/L, y exceso de base 19.1 mmol/L (tabla 2). Se realiza Tomografía de cráneo (figura 2) sin evidencia de afectaciones intraparenquimatosas ni óseas, descartando diagnósticos diferenciales como accidentes cerebro vasculares, hipoglucemia, hipoxia y alteraciones neurológicas estructurales, así como complicaciones propias del síndrome tóxico como rabdomiólisis, lesión renal aguda, coagulación intravascular diseminada, o fallo multiorgánico agudo.

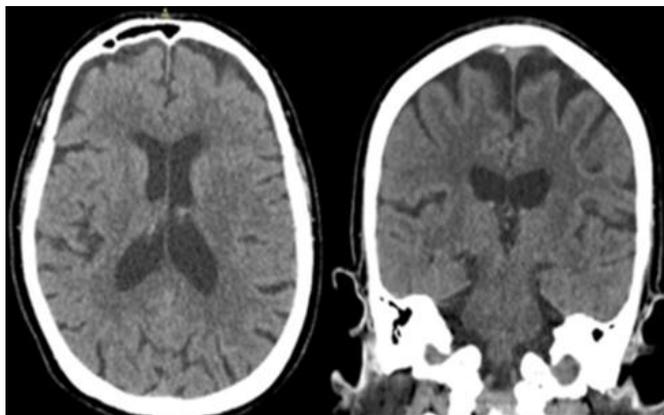
\*e-mail: karelzertuchelopez@gmail.com

**Tabla 1.** Constantes vitales y parámetros analíticos en ingreso a urgencias. Fuente: Expediente clínico.

SAT O <sub>2</sub>		FR	TA	TA MEDIA		FC	TEMP	
98%		28 x min	160/80 mmhg	107 mmHg		114 x min	38°C	
Leu	Hba	Plaq	Creat Cin	Na	K	Cl	Creat	Glu
9330	12.8 gr	309000	98 UI/L	141 mmol/L	4.9 mmol/L	109 mmol/L	0.80 mg/dl	130mg/dl



**Figura 1.** Características de las pupilas durante la exploración en el área de triage.



**Figura 2.** Tomografía Axial simple de cráneo sin lesiones.

La paciente es ingresada al área de urgencias con sospecha de intoxicación por escopolamina por flor del género *Brugmansia* arborea, con síndrome tóxico anticolinérgico manifiesto por midriasis, taquicardia, hipertensión, delirium, sequedad de mucosa y fiebre. Se inicia manejo con medidas de soporte, manejo farmacológico con benzodiacepina por el estado de agitación. Después de la aplicación y transcurrida una hora al persistir la sintomatología se inicia manejo con neostigmina (en ausencia de fisostigmina en nuestra unidad hospitalaria), 0.5 mg en bolo, resultando con notoria mejoría clínica. Evoluciona de manera favorable, manteniéndose en vigilancia por 48 h, con mejoría de la función neurológica, PAM 83 mmHg, T de 37°C y con estabilidad hemodinámica (Frecuencia cardiaca 60 por min) por lo que se da de alta con seguimiento en consulta externa.

**Discusión**

El toxindrome anticolinérgico puede ser el resultado de intoxicación por abuso de fármacos o consumo de plantas. En la actualidad se conocen más de 600 compuestos con propiedades anticolinérgicas que están incluidos en: 1) plantas que contienen alcaloides tropánicos (belladona, estramonio, beleño negro, brugmasia, etc.), 2) preparados farmacéuticos (atropina, homatropina, escopolamina), 3) fármacos antihistamínicos (difenhidramina, dimenhidrinato), 4) fármacos administrados para la enfermedad de Parkinson (benzatropina, biperideno), 5) antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina,

clomipramina), o 6) derivados de la fenotiazina (clorpromazina, levomepromazina, perazina, perfenazina, proclorperazina, promacina, prometazina, tietilperazina, tioridacina, trifluoperazina) (Verheijden , 2016).

El cuadro clínico característico del síndrome anticolinérgico con el antecedente de la ingesta de la infusión de flores hizo sospechar que no se trataba de un cuadro neurológico, ni de intoxicación por fármacos, sino de un cuadro de intoxicación por consumo de *Brugmansia* (*Brugmansia* arborea), planta de la familia de las solanáceas, comúnmente conocida como trompeta de ángel o flor invertida (Goldfarb et al, 2018).

En México, la *Brugmansia*, llamada floripondio, ha sido empleada en medicina tradicional en diferentes culturas con fines analgésicos, afrodisíacos, nematicidas, inductor del sueño, relajante muscular y en ceremonias o rituales, más recientemente se ha generalizado su empleo para reumatismo, asma e inflamación. Se utilizan las flores, frutos, tallos y raíces de la planta, y se han identificado diferentes compuestos químicos, como alcaloides, compuestos volátiles (principalmente terpenos), cumarinas, flavonoides, esteroides e hidrocarburos (Petricevich et al, 2020).

Las concentraciones de alcaloides en la planta varían según la estacionalidad, el estado nutricional y el órgano, en las hojas, se presentan concentraciones de atropina ( $0.79 \pm 0.03$  mg/g) y escopolamina ( $0.72 \pm 0.05$  mg/g) en presentación seca, mientras que las concentraciones de escopolamina en el néctar se incrementan en las flores ( $149.80 \pm 6.01$  µg/mL, cada flor de *Brugmansia* contiene 0.65 mg de escopolamina y 0,3 mg de atropina, existen reportes de caso de muerte con la infusión de 10 flores (Kerchner et al, 2015; Pisquiy-Quemé, 2022).

Los alcaloides son antagonistas de la acetilcolina en los receptores muscarínicos, inhibiendo la acción de este transmisor en efectores autónomos y músculo liso, disminuyendo las secreciones mucosas y bloqueando la acción del nervio vago miocárdico, dando como signos la midriasis, sequedad de boca, delirio, enrojecimiento de la piel, sequedad de la piel, agitación/agresividad, disminución de los ruidos intestinales, parálisis ileal, somnolencia, alucinaciones visuales, taquicardia, retención urinaria, fiebre, aumento de la presión arterial sistólica, una escala de coma de Glasgow (GCS) menor a 12 puntos, vértigo, disminución de la temperatura y dificultad para respirar antes del coma (Doan et al, 2019; Petricevich et al, 2020).

El síndrome anticolinérgico ocurre por antagonismo competitivo de la acetilcolina en los receptores muscarínicos periféricos y centrales (Carrillo-Esper et al, 2012). Existen al menos cinco subtipos muscarínicos, los receptores M1 se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y están implicados en la percepción, la atención y el funcionamiento cognitivo, los receptores muscarínicos periféricos forman parte del sistema nervioso autónomo y están inervados por nervios colinérgicos postganglionares, en tanto los receptores M2 se encuentran en el cerebro y el corazón al igual que los M4 en el cerebro y los pulmones, finalmente los receptores M3 se encuentran en las glándulas salivales; los receptores M5 son similares a los M1 y M3 con localización en cerebro corazón y glándulas salivales (Flores Soto & Segura Torres, 2005).

El tratamiento consiste en protección de la vía aérea, apoyo hemodinámico, monitorización cardiorrespiratoria,

electrocardiográfica y lavado gástrico como primeras medidas, el uso de carbón activado para bloquear la absorción y benzodiazepinas para el manejo de agitación y crisis convulsivas (Gomez Parra et al, 2003). El lavado gástrico y el carbón activado son útiles en las primeras 2 horas posterior a la ingesta del tóxico, pero podrían utilizarse hasta las primeras 24 horas, ya que el efecto anticolinérgico reduce el peristaltismo gastrointestinal, en el presente caso no se disponía por ello no se empleó.

El papel coadyuvante en el tratamiento del toxidrome en pacientes cuyo síntoma predominante es agitación leve a moderada sin alucinaciones ni trastornos del pensamiento puede verse mejorado con el uso de benzodiazepinas, pero en el caso de adulto mayor las complicaciones asociadas por acumularse aumentan el riesgo de depresión del sistema nervioso central con compromiso de la mecánica ventilatoria, además de que la propia intoxicación puede empezar a manifestar alteraciones psiquiátricas subyacentes (Bernal et al, 2013; Dawson & Buckley, 2015).

El antídoto ideal para el síndrome anticolinérgico sería un agonista selectivo del receptor M1, la fisostigmina es el inhibidor terapéutico prototípico de la colinesterasa y el más comúnmente reportado en uso terapéutico para el delirio anticolinérgico a dosis de 1 a 2 mg durante 3 a 5 minutos con dosis ajustadas adicionales de 0,5 a 1 mg cada 5 minutos hasta que se resuelva el delirium o aparecieron signos colinérgicos (Dawson & Buckley, 2015). En México en zona de provincia no se tiene disponibilidad por lo que la opción de emplear neostigmina a dosis de 0,5-2,5 mg fue la única disponible con resultado favorable (Gomez Parra et al, 2003).

El tratamiento es principalmente sintomático y se realiza en condiciones de monitorización cardiaca, empleando medidas agresivas para el mantenimiento de la función cardiovascular, en tanto se revierte la intoxicación (Dawson & Buckley, 2015). En los reportes de casos de intoxicación por escopolamina se menciona poco sobre las repercusiones neurológicas, pero existen reportes de procesos atencionales a baja velocidad y dificultades en el mantenimiento de la atención, especialmente en tareas de atención auditiva, presentando un gran número de errores por comisión y omisión, así como en personas con rasgos de personalidad esquizoide tiene mayor riesgo de síntomas psicóticos (Bernal et al, 2013).

El síndrome anticolinérgico en el territorio mexicano ha sido reportado solo en una ocasión debido a intento de suicidio consumiendo fármacos (Carrillo-Esper et al, 2012), y a pesar del gran empleo en la medicina tradicional, no se había documentado anteriormente ningún caso de intoxicación directa con Brugmansia en infusiones, ni tampoco por uso recreativo. Este es el primer reporte de intoxicación por uso medicinal en México, por ello es necesario considerar esta entidad entre las causas de síndrome confusional en el adulto mayor dado el gran uso que se hace de la planta y la poca especificidad en cuanto a la dosis en medicina tradicional, aunado a ello la disponibilidad que existe de la planta y la difusión entre la población por sus supuestos efectos curativos.

El interrogatorio juega un papel crucial en los casos de síndrome confusional agudo del adulto mayor. En este caso permitió identificar la planta y proponer el diagnóstico, con lo que se redujo tiempo en estudios de diagnóstico y agilizar tratamiento.

## Conclusión

La intoxicación en adultos mayores se ha reportado principalmente por accidentes farmacológicos por lo que este trabajo de caso clínico nos brinda la oportunidad de ampliar la perspectiva clínica en cuanto a otra forma de intoxicación en países que emplean el floripondio en la medicina tradicional.

La neostigmina no es el fármaco de elección para el manejo como antídoto, sin embargo, en el territorio mexicano específicamente en el estado de Oaxaca, es el fármaco que se dispone con mayor accesibilidad. Su administración por vía intravenosa dio lugar a una

rápida reversión de los síntomas.

## Bibliografía

- Bautista-Oropesiano M, Moreno-Duaso S, Gómez-Caverzaschi V, Toledano-Sierra P, Orueta Sánchez R. Consumo de fármacos anticolinérgicos en ancianos entre setenta y cinco y ochenta años consultantes de un servicio de urgencia. *Rev Esp Salud Pública*. 2023; 97, 1-10. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10540903/pdf/1135-5727-resp-97-e202307061.pdf>
- Bernal A, Gómez D, López S, Acosta MR. Implicaciones neuropsicológicas, neurológicas y psiquiátricas en un caso de intoxicación por escopolamina. *Psychologia. Avances de la Disciplina*, 2013; 7(1), 105-118. En: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1900-23862013000100010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-23862013000100010)
- Carrillo-Esper R, Ramírez-Rosillo FJ, Garnica-Escamilla MA, Méndez-García JA, Esquivel-Méndez S, Rocha-Rodríguez MG, Carrillo-Córdova CA. Síndrome anticolinérgico. *Med Sur*. 2012;19(4):244-249. En: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=46915>
- Dawson A. H., Buckley N. A. Pharmacological management of anticholinergic delirium -theory, evidence and practice. *Br J Clin Pharmacol*, 2015; 81(3), 516-524. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4767198/>
- Doan UV, Wu ML, Phua DH, Mendez-Rojas B, Yang CC. Datura and Brugmansia plants related antimuscarinic toxicity: an analysis of poisoning cases reported to the Taiwan poison control center. *Clinical Toxicology*. 2018; 57(4), 246-253. En: <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1513527>.
- Elena-González A, Goicoechea-Mateo A, Gimeno-Villa AC, Fernández-Calleja G, Vieira-Lista E. Sumisión química con escopolamina, a propósito de un brote de tres casos. *Rev. Toxicol*. 2020; 12: (37), 98 - 100. En: <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/2020/12/vol-37.2-34-36.pdf>
- Flores Soto, ME, Segura Torres JE. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*, 2005; 6: (4), 315-326. En: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2005/rmn054f.pdf>
- Goldfarb J, Pesin N, Margolin E. Gardening and dilated pupils: an interesting case of anisocoria from Brugmansia versicolor. *Can J Ophthalmol*. 2019 Apr;54(2):e59-e61. doi: 10.1016/j.cjco.2018.05.004. Epub 2018 Oct 9. PMID: 30975362. En: [https://www.canadianjournalofophthalmology.ca/article/S0008-4182\(18\)30202-3/fulltext](https://www.canadianjournalofophthalmology.ca/article/S0008-4182(18)30202-3/fulltext)
- Gómez-Parra J, Gutiérrez-Beltrán MR, Santoyo de la Peña MN. Síndrome anticolinérgico en anestesia. *Rev Mex Anest*. 2003; 26, 209-2016. En: <https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2003/cma034g.pdf>
- Instituto de Salud Pública de Chile. Floripondio. 2015. Acceso 18 de julio de 2024). Disponible en: [www.ispch.gov.cl: https://www.ispch.gov.cl/wp-content/uploads/2023/03/Floripondio-21022023A.pdf](http://www.ispch.gov.cl: https://www.ispch.gov.cl/wp-content/uploads/2023/03/Floripondio-21022023A.pdf)
- Kerchner A, Darók J, Bacskay I, Felinger A, Jakab G, Farkas Á. Protein and alkaloid patterns of the floral nectar in some solanaceous species. *Acta Biol Hung*. 2015 Sep;66(3):304-15. doi: 10.1556/018.66.2015.3.6. PMID: 26344026. En: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26344026/>
- Petricевич VL, Salinas-Sánchez DO, Avilés-Montes D, Sotelo-Leyva C, Abarca-Vargas R. Chemical Compounds,

Pharmacological and Toxicological Activity of Brugmansia suaveolens: A Review. *Plants* (Basel). 2020 Sep 8;9(9):1161. doi: 10.3390/plants9091161. PMID: 32911850; PMCID: PMC7570077. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7570077/>

13. Pisquiy-Quemé A. Síndrome anticolinérgico secundario al consumo de infusión de “Flor de Campana”, informe de caso. *Rev. méd. (Col. Méd. Cir. Guatem.)*. 2022;161(4):444-447. En: [file:///C:/Users/User/Downloads/569+-+S%C3%ADndrome+anticolin%C3%A9rgico+secundario+al+consumo+de+infusi%C3%B3n+de+-Flor+de+Campana-+-+informe+de+caso+-+v161i4-LO-V001%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/569+-+S%C3%ADndrome+anticolin%C3%A9rgico+secundario+al+consumo+de+infusi%C3%B3n+de+-Flor+de+Campana-+-+informe+de+caso+-+v161i4-LO-V001%20(4).pdf)
14. Verheijden NA, Koch BC, Brkic Z, Alsmá J, Klein Nagelvoort-Schuit SC. A 45-year-old woman with an anticholinergic toxidrome. *Neth J Med*. 2016 Mar;74(3):133-5. PMID: 27020994. En: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27020994/>

# Evaluación de la seguridad *in vitro* e *in vivo* de compuestos azufrados naturales para su uso potencial en el ámbito agroalimentario: revisión bibliográfica

Cascajosa-Lira A.<sup>1</sup>, Prieto A.I.<sup>1</sup>, Pichardo S.<sup>1</sup>, Guzmán-Guillén R.<sup>1\*</sup>, Jos A.<sup>1</sup>, Aguinaga-Casañas M.A.<sup>2</sup>, Baños A.<sup>2</sup>, Cameán A.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España.

<sup>2</sup>DMC Research Center SLU, Camino de Jayena s/n, Alhedin, 18620, Granada, España.

**Resumen:** Recientemente, el interés por los compuestos organosulfurados ha aumentado debido a sus numerosas propiedades beneficiosas en el ámbito agroalimentario y de la salud. En este estudio se han evaluado diversas propiedades relacionadas con aspectos de la seguridad de compuestos orgánicos de azufre a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados señalan que los compuestos derivados s-propilglutatió y s-propilcisteína no presentan una actividad citotóxica o genotóxica relevante en estudios realizados en cultivos celulares. Además, el propilpropano tiosulfonato, propilpropano tiosulfinato, s-propilglutatió, s-propilcisteína y el sulforafano no exhiben efectos genotóxicos en estudios realizados *in vivo*. Así mismo, se observó que el propilpropano tiosulfonato, el propilpropano tiosulfinato y el sulforafano muestran un perfil seguro a largo plazo en ensayos subcrónicos realizados en roedores. Estos hallazgos confirman la seguridad de los compuestos organosulfurados evaluados, subrayando la necesidad de realizar estudios toxicológicos completos para comprender plenamente sus efectos en sistemas biológicos y garantizar su uso seguro en aplicaciones agroalimentarias.

**Palabras clave:** *Allium*; *in vitro*; *in vivo*; citotoxicidad; genotoxicidad.

**Abstract:** *In vitro* and *in vivo* safety assessment of natural sulfur compounds for their potential use in the agri-food sector: bibliographic review.

Recently, interest in organosulfur compounds has increased due to their numerous beneficial properties in the agri-food and health fields. In this study, various safety aspects of organic sulfur compounds have been evaluated through *in vitro* and *in vivo* assays. The results indicate that propyl-propane thiosulfonate, propyl-propane thiosulfinate, s-propyl glutathione, s-propyl cysteine and sulforaphane do not exhibit genotoxic effects *in vivo*. In addition, s-propyl glutathione and s-propyl cysteine do not exhibit relevant cytotoxic or genotoxic activity in cell culture studies. Moreover, it was observed that propyl-propane thiosulfonate, propyl-propane thiosulfinate and sulforaphane show a safe long-term profile in subchronic assays in live animals. These findings confirm the safety of the evaluated organosulfur compounds, emphasizing the need for comprehensive toxicological studies to fully understand their effects on biological systems and ensure their safe use in agro-food applications.

**Keywords:** *Allium*; *in vitro*; *in vivo*; cytotoxicity; genotoxicity.

## Introducción

El género *Allium* incluye entre 600 y 700 especies como el ajo (*A. sativum*), la cebolla (*A. cepa*) o el puerro (*A. porrum*) (Putnik et al., 2019). Desde la antigüedad, las especies de este género han sido cultivadas por los humanos, y estuvieron entre las primeras plantas domésticas documentadas (Nicastro et al., 2015). El principal interés de estas especies reside en sus compuestos organosulfurados (OSCs), como el propilpropano tiosulfonato (PTSO), propilpropano tiosulfinato (PTS), s-propilglutatió (GSSP), s-propilcisteína (CSSP), que son metabolitos secundarios con actividad biológica y un aroma característico. Además, se ha demostrado que el sulforafano (SFN), otro OSC presente en verduras crucíferas pertenecientes al género *Brassica*, como la coliflor y el brócoli, mejora el estrés oxidativo, la capacidad antioxidante y la neuroinflamación (Baralic et al., 2024). Cuando los tejidos de la planta se dañan, se produce una cascada de reacciones enzimáticas por parte de la aliinasa, degradando los compuestos iniciales y dando lugar a nuevos metabolitos altamente

reactivos y biológicamente activos (Ramírez et al., 2017). Los OSCs poseen interesantes propiedades antimicrobianas, antivirales, antiprotzoarias, antioxidantes, antidiabéticas, antiespasmódicas, anticancerígenas, antimutagénicas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, neuroprotectoras, hipotensoras, hipoglucemiantes, inmunomoduladoras y prebióticas (Ariza et al., 2021; Guillamón et al., 2021; Putnik et al., 2019; Rabelo-Ruiz et al., 2021; Sorlozano-Puerto et al., 2018). Todas estas propiedades le otorgan al género *Allium* diversos usos en varias áreas del conocimiento, y aunque tradicionalmente este género se ha utilizado con fines medicinales, en los últimos años se ha potenciado su uso en la industria agroalimentaria (Teshika et al., 2019).

Así, los extractos de *Allium* ricos en OSCs pueden usarse potencialmente en los sectores de alimentación humana y piensos para animales como sustitutos de los conservantes sintéticos (Ribeiro-Santos et al., 2017; Sorlozano-Puerto et al., 2018). Sin embargo, su uso en alimentos es limitado debido a sus propiedades organolépticas (Poojary et al., 2017). Varios OSCs, como el PTSO y su principal derivado, el PTS, han demostrado tener potenciales aplicaciones en el almacenamiento de maíz, principalmente debido a su actividad antifúngica y antimicotogénica. Podrían usarse en concentraciones del orden de partes por millón para reducir hasta un 90% las concentraciones de micotoxinas producidas por *Fusarium* (Mylona et al., 2019). Además, debido a sus actividades antioxidantes y antibacterianas, el PTSO y el PTS insertados en una matriz sintética también se han propuesto para su uso en envases activos de alimentos para conservar mejor las ensaladas (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015, 2016).

La introducción de estas nuevas aplicaciones podría llevar a un aumento en la exposición de los consumidores, haciendo necesario determinar un rango seguro de concentraciones para su uso en la industria. Aunque se ha revisado exhaustivamente la toxicidad de algunos OSCs, especialmente aquellos que contienen grupos alquilo en su estructura (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2013), la seguridad de los OSCs que poseen grupos más complejos como los tiosulfonatos o tiosulfonatos aún no ha sido analizada en profundidad. Por todo ello, el objetivo del presente trabajo es poner de manifiesto los ensayos de evaluación toxicológica de los OSCs de interés agroalimentario: PTSO, PTS, GSSP, CSSP, SFN *in vitro* e *in vivo* disponibles en la bibliografía como un primer paso a su posible empleo como aditivo alimentario.

## Materiales y Métodos

Se llevó a cabo una búsqueda en la literatura científica utilizando las plataformas de Science Direct y Pubmed. Las palabras clave empleadas fueron PTSO, PTS, GSSP, CSSP, SFN e *in vitro* o *in vivo*. Los criterios de inclusión en este trabajo fueron los siguientes: 1) artículos disponibles en inglés; 2) artículos publicados antes del 1 de Junio de 2024 y después del 1 de enero de 2000; 3) estudios realizados *in vitro* o *in vivo*; 4) estudios que realicen investigaciones relevantes sobre la potencial toxicidad de los OSCs (PTSO, PTS, GSSP, CSSP, SFN), como estudios de genotoxicidad, agudos, subcrónicos, etc. Se aplicaron los siguientes criterios de exclusión: 1) revisiones; 2) artículos publicados en idiomas distintos del inglés; 3) actas y disertaciones 4) libros o capítulos de libros; 5) material editorial; 6) estudios no centrados en la toxicidad de OSCs. Después de revisar los resúmenes y confirmar que los estudios eran adecuados y pertinentes para los objetivos establecidos, se eligieron un total de 12 artículos (Figura 1).

\*e-mail: rguzman1@us.es



**Figura 1.** Esquema de los diferentes estudios seleccionados para la presente revisión.

## Resultados y Discusión

En el presente trabajo se han abordado ensayos *in vitro* e *in vivo* con relación a la citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad, estrés oxidativo, morfología celular, biotransformación, estudios agudos y subcrónicos, y estudios sobre la reproducción y el desarrollo.

### Citotoxicidad

Los estudios de citotoxicidad de OSCs se han llevado a cabo para PTSO, PTS, GSSP y CSSP y son principalmente el ensayo de reducción de MTS (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfopenil) -2H-tetrazolio), el ensayo del

contenido total de proteínas (CP) y el ensayo de exclusión del azul tripán (AT). Respecto al PTSO, además de los ensayos anteriores, también se ha llevado a cabo el ensayo de captación de rojo neutro (RN). Los modelos *in vitro* utilizados son las líneas celulares: HepG2, Caco-2 y L5178Y tk+/- . Los tiempos de exposición ensayados fueron 24 y 48 horas en todos los ensayos, exceptuando el ensayo de exclusión del azul tripán, cuyos tiempos de exposición fueron 4 y 24 horas. Las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) para cada una de las sustancias en las líneas celulares Caco-2 y HepG2 están expresadas en la tabla 1. Para la línea celular L5178Y tk+/- únicamente se ha realizado el ensayo de exclusión del azul tripán, cuyas CE<sub>50</sub> obtenidas fueron 20 µM y 40 µM para 4 y 24 horas, respectivamente, en el caso del PTSO (Mellado-García et al., 2015). Para PTS en las mismas condiciones, las CE<sub>50</sub> fueron de 25 µM y 17,5 µM a las 4 y 24 horas, respectivamente (Mellado-García et al., 2017).

Estos resultados indican que la exposición a PTSO y PTS principalmente tiene un impacto inhibitorio sobre la viabilidad de las células dependiente de la concentración en los ensayos realizados tanto en células Caco-2, HepG2 como L5178Y tk+/- , con distintos grados de sensibilidad (Tabla 1) y duración en la respuesta. Respecto a los derivados GSSP y CSSP, no es posible alcanzar la CE<sub>50</sub> incluso a las máximas concentraciones ensayadas (50–450 µM) (Cascajosa-Lira et al., 2023a).

### Mutagenicidad *in vitro*

Los resultados de los estudios de mutagenicidad se encuentran en la tabla 2. Los OSCs evaluados han sido PTSO, PTS, GSSP y CSSP y los ensayos realizados el test de Ames (para todos ellos) y el ensayo de linfoma de ratón (MLA) en presencia y ausencia de la fracción microsomal S9 (sólo en el caso de PTSO y PTS).

El PTSO no mostró un aumento en el número de colonias revertientes

**Tabla 1.** Concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de PTSO, PTS, GSSP y CSSP expresadas en µM para las líneas celulares Caco-2 y HepG2, en los ensayos MTS, RN y CP.

Sustancia ensayada	Línea celular	CE <sub>50</sub> (µM)						Referencia
		MTS		RN		CP		
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	
PTSO	Caco-2	374,2 ± 2,3	388,3 ± 1,6	367,9 ± 2,8	366,5 ± 1,9	369,8 ± 3,4	350,9 ± 1,5	Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015
	HepG2	415,14*	401,6*	400,7 ± 1,4	395,7 ± 2,6	380,8 ± 2,7	368,1 ± 3,1	Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015
PTS	Caco-2	340,0*	193,0*	280,0*	187,0*	-	228,0*	Mellado-García et al., 2017
GSSP	Caco-2	FR	FR	-	-	FR	FR	Cascajosa-Lira et al., 2023a
CSSP	Caco-2	FR	FR	-	-	FR	FR	Cascajosa-Lira et al., 2023a

FR= Fuera de Rango. Por encima del límite de solubilidad. \* Dato de ± SD no aportado por el estudio.

**Tabla 2.** Principales resultados en estudios de mutagenicidad para los compuestos PTSO, PTS, GSSP, CSSP y SFN.

Sustancia ensayada	Ensayo				Referencia
	Ames		MLA		
	-S9	+S9	4h	24h	
PTSO	Resultados negativos para las cepas TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 usando concentraciones entre 1-20 mM		Resultados negativos para concentraciones entre 2,5-30 µM	Resultados positivos para concentraciones entre 2,5-20 µM	Mellado-García et al., 2015
PTS	Resultados negativos para TA97, TA98, TA100, TA102 y TA104 usando concentraciones entre 8,75 y 280 µM	Aumento del número de colonias para la cepa TA104, pero con IM < 2 a concentraciones entre 8,75 y 280 µM	Resultados negativos para concentraciones entre 0,9-15,75 µM		Mellado-García et al., 2017
GSSP	Resultados negativos a concentraciones entre 5000–312,5 µg/placa	-	-	-	Cascajosa-Lira et al., 2023a
CSSP	Resultados negativos a concentraciones entre 250–15,63 µg/placa	-	-	-	Cascajosa-Lira et al., 2023a
SFN	Resultados negativos para las cepas TA97, TA98, TA100 y TA102 usando concentraciones 62-5000 µg de BSE/placa		-	-	Zhou et al., 2015

en el test de Ames con cepas bacterianas, incluso a la concentración más alta probada (20 mM), tanto en presencia como en ausencia de S9, indicando ausencia de genotoxicidad en este ensayo. Además, a pesar de que en el ensayo MLA con células L5178Y tk<sup>+</sup>/- se observaron aumentos en las frecuencias de mutación inducida tras 24 horas de exposición a concentraciones de 2,5 a 20 µM, no se detectaron aumentos significativos tras un tratamiento de 4 horas. Estos resultados indican que la mutagenicidad del PTSO podría estar influenciada por la duración de la exposición y la concentración utilizada (Mellado-García et al., 2015).

Los estudios sobre la mutagenicidad del PTS indicaron que, en las cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 y TA100, no hubo un aumento en el número de colonias revertientes a ninguna de las concentraciones de PTS probadas, con o sin el sistema de activación metabólica S9. Tan sólo la cepa TA104 mostró un aumento en las colonias revertientes a las dos concentraciones más bajas en presencia de S9. Por su parte, en la cepa TA102, se observó una disminución en las colonias en ausencia de S9 (8,75-140 µM) y en presencia de S9 (8,75-35 µM), lo que podría indicar una posible interferencia con el crecimiento bacteriano más que una mutagenicidad directa. Además, el índice mutagénico fue inferior a 2 en todas las cepas, indicando que PTS no es mutagénico en estas condiciones. En el MLA con células L5178Y tk<sup>+</sup>/- tratadas con PTS durante 4 y 24 horas, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de mutación inducidas. Los controles positivos confirmaron la validez de los ensayos (Mellado-García et al., 2017).

Los estudios de mutagenicidad realizados con GSSP y CSSP, utilizando cepas de *S. typhimurium* (TA1535, TA102, TA100, TA98 y TA97A), no mostraron aumentos significativos en el número de colonias revertientes en ninguna de las cepas a las concentraciones probadas para cada sustancia (GSSP: 5000–312,5 µg/placa y CSSP: 250–15,63 µg/placa). Además, el índice de mutagenicidad (IM) de los compuestos ensayados tuvo valores de 0,7-1,4 para GSSP y 0,6-1,2 para CSSP, manteniéndose siempre por debajo de 2 (Cascajosa-Lira et al., 2023a).

También se han llevado a cabo estudios de mutagenicidad y genotoxicidad para evaluar el extracto de brócoli rico en glucorafanina (BSE). En la prueba de Ames, cuatro cepas de *S. typhimurium* (TA97, TA98, TA100 y TA102) fueron expuestas a concentraciones de hasta 5000 µg de BSE/placa, tanto en presencia como en ausencia del sistema de activación metabólica S9. Los resultados no indicaron actividad mutagénica (Zhou et al., 2015).

#### Genotoxicidad in vitro

Los estudios de genotoxicidad llevados a cabo con OSCs (PTSO, PTS, GSSP, CSSP y SFN) son el ensayo de micronúcleos (MN) en la línea celular L5178Y tk<sup>+</sup>/- y el ensayo cometa estándar y modificado con

enzimas en la línea celular Caco-2. Los resultados se muestran en la tabla 3.

En el ensayo de MN, las concentraciones de PTSO seleccionadas se basaron en la CE<sub>50</sub> 0-40 µM de la viabilidad celular en el modelo experimental considerado. En ausencia de la mezcla de activación metabólica S9, no se observó un aumento significativo en la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) y tampoco hubo variaciones significativas en el índice de división nuclear (NDI). Sin embargo, en presencia de la mezcla S9, se detectó un aumento ( $p \leq 0.001$ ) en la frecuencia de BNMN a partir de 15 µM, lo que sugiere que, a partir de determinadas concentraciones, los metabolitos de PTSO pueden inducir la formación de MN (Mellado-García et al., 2015).

Sin embargo, en el ensayo cometa, PTSO no indujo roturas de cadenas de ADN en células Caco-2 a ninguna de las concentraciones probadas (0-50 µM) después de 24 ó 48 horas de exposición. Además, la digestión enzimática de los núcleos con endonucleasa III (EndoIII) y formamidopirimidina ADN glicosilasa (FPG) no reveló un aumento en el daño del ADN en células tratadas con PTSO, lo que demuestra que este compuesto no causa daño genotóxico indirecto por oxidación del ADN (Mellado-García et al., 2015).

Los estudios sobre la genotoxicidad del PTS indican que este compuesto puede inducir daños genéticos en células L5178Y tk<sup>+</sup>/-. Se observó un aumento significativo en la frecuencia de BNMN a la concentración más alta probada (17,25 µM) en ausencia del sistema de activación metabólica S9. Además, se registraron incrementos significativos a concentraciones de 20 y 25 µM en presencia de S9. Sin embargo, no se encontraron variaciones significativas en el NDI en comparación con el grupo control en ninguna de las concentraciones probadas, tanto en presencia como en ausencia de S9, lo que sugiere que los efectos observados pueden depender de factores específicos de la concentración y las condiciones del ensayo (Mellado-García et al., 2017).

En el ensayo del cometa estándar, PTS no indujo roturas de ADN en células Caco-2 a concentraciones de 70 y 140 mM tras 24 y 48 horas de exposición, indicando ausencia de genotoxicidad a estos niveles. Aunque se observaron aumentos significativos en las roturas de ADN a 280 µM PTSO después de ambos tiempos de exposición en comparación con el grupo control, estos efectos fueron más pronunciados tras 48 horas, con la cantidad de ADN en la cola del cometa aproximadamente el doble que después de 24 horas. Cabe señalar que no se observó un aumento en el daño al ADN tras la digestión enzimática de los núcleos con Endo III o FPG en células expuestas a PTS. Por su parte, los controles positivos en todos los experimentos mostraron aumentos significativos en el porcentaje de ADN en la cola del cometa, confirmando la eficacia del ensayo (Mellado-García et al., 2017).

Los estudios de genotoxicidad de GSSP y CSSP indicaron ausencia de

**Tabla 3.** Principales resultados en estudios de genotoxicidad para los compuestos PTSO, PTS, GSSP y CSSP.

Sustancia ensayada	Ensayo				Referencia
	Micronúcleos		Cometa estándar	Cometa modificado con enzimas	
	-S9	+S9			
PTSO	Resultados negativos a concentraciones entre 5-40 µM	Resultados positivos a concentraciones de 15 y 20 µM	Resultados negativos a concentraciones entre 5-50 µM	Resultados negativos a concentraciones entre 5-50 µM	Mellado-García et al., 2015
PTS	Resultados positivos a la concentración más alta ensayada (17,25 µM)	Resultados positivos a concentraciones de 20 y 25 µM	Resultados positivos a las 24 y 48h a la concentración de 280 µM	Resultados negativos a concentraciones entre 5-50 µM	Mellado-García et al., 2017
GSSP	Resultados negativos a concentraciones entre 16,25-260 µM	-	Resultados negativos a concentraciones entre 112,5-450µM	Resultados negativos a concentraciones entre 112,5-450 µM	Cascajosa-Lira et al., 2023a
CSSP	Resultados negativos a concentraciones entre 31,25-500 µM	-	Resultados negativos a concentraciones entre 112,5-450 µM	Resultados negativos a concentraciones entre 112,5-450 µM	Cascajosa-Lira et al., 2023a

cambios significativos en la frecuencia de BNMN y en el NDI en células L5178Y tk<sup>+</sup> tras exposiciones de 4 y 24 horas, comparado con el control negativo. Además, en los ensayos del cometa estándar y modificados con enzimas (Endo III y FPG) en células Caco-2, GSSP y CSSP no produjeron roturas de ADN ni daño oxidativo del ADN a las concentraciones probadas (112,5–450 μM) tras 24 ó 48 horas de exposición. Los controles positivos confirmaron la validez de los ensayos. En resumen, GSSP y CSSP no mostraron efectos genotóxicos en las condiciones evaluadas (Cascajosa-Lira et al., 2023a).

A pesar de que se han realizado investigaciones sobre sus efectos biológicos y toxicológicos, la genotoxicidad específica del SFN no ha sido objeto de análisis en cultivos celulares.

A pesar de que PTSO y PTS mostraron algunos resultados positivos en ensayos *in vitro* de mutagenicidad y genotoxicidad bajo condiciones específicas de concentración y tiempo de exposición, en presencia de la fracción de activación metabólica S9, los metabolitos resultantes de las reacciones de conjugación en fase II, como la unión con glutatión y cisteína, no exhiben estos efectos. Esto sugiere que los procesos de biotransformación en fase II pueden neutralizar los efectos perjudiciales observados con los compuestos parentales, subrayando la importancia de estas rutas metabólicas en la mitigación del potencial genotóxico de estos compuestos.

#### *Estudios de estrés oxidativo in vitro*

Se han realizado estudios de evaluación de las propiedades del PTSO para proteger y revertir efectos tóxicos, utilizando como agente tóxico el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015). Las concentraciones usadas de PTSO fueron: 65,3; 130,6 y 261,1 μM, y la de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM.

En los ensayos de protección (células tratadas con PTSO y posteriormente expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), no se registró un efecto significativo en el contenido de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) después de 24 horas. Sin embargo, en células Caco-2 pretratadas con PTSO durante 48 horas antes de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los niveles de ERO se mantuvieron similares al grupo control y menores que los observados tras la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De manera similar, no se observaron diferencias significativas en los niveles de glutatión (GSH) entre el grupo pretratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y aquellos expuestos a PTSO durante 24 horas. No obstante, después de 48 horas de exposición a PTSO, los niveles de GSH fueron significativamente más altos que en el grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo similares al grupo control, lo que sugiere un efecto protector del PTSO frente al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En los ensayos de reversión (células expuestas primero a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente tratadas con PTSO), el PTSO redujo significativamente los niveles de ERO en comparación con el grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en todas las concentraciones probadas después de ambos tiempos de pretratamiento. Respecto a los niveles de GSH, no se observaron diferencias significativas entre los grupos expuestos a PTSO y el grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ninguna de las concentraciones probadas tras ambos tiempos de exposición.

#### *Estudios sobre la morfología celular*

Solo se encuentran disponibles estudios de morfología celular para PTSO en las líneas celulares HepG2 y Caco-2, correspondientes a hepatocarcinoma humano y adenocarcinoma de colon humano respectivamente, y a concentraciones correspondientes a la CE<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub>/2 e CE<sub>50</sub>/4 de cada línea celular (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015). Dado que se ha documentado la actividad antitumoral del PTSO en diversas líneas celulares, como MCF-7, T-84 y HT-29, induciendo apoptosis celular a bajas concentraciones (Guillamón et al., 2023), es razonable anticipar cambios morfológicos significativos en líneas celulares neoplásicas tras la exposición a este compuesto. De hecho, la exposición de células Caco-2 a PTSO reveló cambios morfológicos significativos a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. A 92,5 μM de PTSO durante 24 horas, se observaron grandes espacios intercelulares y nucleolos segregados. A las 48 horas con la misma

concentración, los resultados fueron similares, pero más intensos, apareciendo autofagosomas. La exposición a 370 μM de PTSO durante 24 horas resultó en una pérdida severa de viabilidad celular, con núcleos dañados y citoplasma necrótico. Las células expuestas a 92,5 μM durante 48 horas presentaron vacuolas autofágicas y mitocondrias con crestas transversales delgadas. A 185 μM durante 24 horas, se observaron núcleos y nucleolos dañados, dilatación en el retículo endoplásmico y mitocondrias alteradas. A 370 μM, el daño fue más pronunciado, con núcleos dañados y órganos necróticos visibles.

En células HepG2, expuestas a 100 μM durante 24 y 48 horas, se observaron núcleos eucromáticos grandes y vesículas secretoras sin cambios morfológicos significativos respecto al control negativo. 400 μM, se detuvo el crecimiento celular, observándose características de apoptosis temprana y necrosis. Después de 48 horas a esta concentración, se encontraron restos celulares en el medio de cultivo y células con MN.

Sin embargo, aunque no se han analizado los cambios morfológicos en células sanas, se ha reportado que el PTSO no llegó a alcanzar la concentración de CE<sub>50</sub> en células MDBK a 100 μg/mL, equivalente a una concentración de 548 μM (Aguinaga et al., 2022), superior a las concentraciones utilizadas en ensayos con líneas celulares tumorales. Por lo tanto, sería relevante realizar estudios adicionales en diversas líneas de células sanas para evaluar exhaustivamente los cambios morfológicos inducidos por el PTSO y confirmar así la seguridad de este compuesto.

#### *Estudios de biotransformación en microsomas hepáticos*

La biotransformación del PTSO fue investigada mediante ensayos *in vitro* con microsomas de hígado de rata macho y hembra y de hígado humano, y la caracterización de los metabolitos se realizó mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (UHPLC-MS/MS). Se diseñó una ruta metabólica que incluía sólo los metabolitos con estructuras químicas bien conocidas. Esta ruta de transformación del PTSO incluye la hidroxilación, reducción y desaturación en la fase I, y la conjugación con glutatión y con cisteína en la fase II. Hasta donde se sabe, esta es la primera aproximación realizada de la ruta metabólica del PTSO (Cascajosa-Lira et al., 2023b). La transformación de PTSO en dipropil disulfuro (DPDS) ha sido descrita previamente por Teyssier y Siess (2000), y en un estudio reciente, también se detectó DPDS en muestras de hígado de rata expuestas a PTSO (García-Nicolas et al., 2023). Cabe señalar que el DPDS es un compuesto autorizado tanto en alimentos destinados al consumo humano como en piensos para animales en la Unión Europea y, por lo tanto, no presenta riesgo para la salud humana (European Commission, Regulation (EU) No 872/2012; European Commission, Regulation (EU) 2017/62).

#### *Genotoxicidad in vivo*

Los estudios de genotoxicidad *in vivo* revisados engloban dos ensayos principales: el ensayo de MN en la médula ósea, y el ensayo cometa estándar y modificado con enzimas en sangre, estómago e hígado. Se han llevado a cabo estudios de genotoxicidad tanto para el PTSO (Mellado-García et al., 2016) como para el PTS (Cascajosa-Lira et al., 2021) y el SFN (Zhou et al., 2015). Sin embargo, no existen estudios *in vivo* para los conjugados: GSSP y CSSP.

El PTSO ha sido evaluado por su potencial genotóxico en estudios recientes utilizando varios ensayos. Por un lado, en el ensayo de genotoxicidad y citotoxicidad en médula ósea, se expresa la proporción de eritrocitos policromáticos (PCE) entre el total de eritrocitos, y el porcentaje de micronúcleos (% MN). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la proporción de PCE/total de eritrocitos entre los grupos experimentales y los controles negativos o positivos. Además, PTSO no indujo un aumento en la frecuencia de MN en eritrocitos inmaduros a ninguna de las dosis probadas (5,5; 17,4 y 55 mg/kg) (Mellado-García et al., 2016).

En el mismo estudio, el PTSO no indujo roturas de cadenas de ADN en

la sangre, el estómago y el hígado a ninguna de las dosis ensayadas (5,5; 17,4 y 55 mg/kg) en el ensayo cometa estándar y su versión modificada por enzimas Endo III y FPG (Mellado-García et al., 2016). Estos resultados indican que el PTSO no provoca daño significativo en el ADN ni induce lesiones oxidativas en los tejidos evaluados, lo que sugiere un efecto no genotóxico en las condiciones ensayadas.

Por otro lado, el PTS también ha sido evaluado *in vivo* con los ensayos de MN y cometa estándar y modificado con enzimas, en ratas expuestas a dosis de 5,5, 17,4, y 55 mg/kg PTS (Cascajosa-Lira et al., 2021). En el ensayo de MN, se observaron diferencias significativas en la relación entre eritrocitos policromáticos (PCE) y eritrocitos normocromáticos (NCE). En los animales tratados con la dosis más alta de 55 mg/kg, tanto en machos como en hembras, hubo una disminución en esta relación ( $p < 0.05$ ). Así mismo, la relación PCE/total de eritrocitos mostró una reducción en machos y hembras a 55 mg/kg ( $p < 0.05$ ) y sólo en hembras a 17,4 mg/kg ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el porcentaje de MN en eritrocitos inmaduros no mostró cambios significativos en ninguno de los grupos de ambos sexos.

En el ensayo cometa estándar y modificado por enzimas, los resultados mostraron que no hubo roturas significativas de cadenas de ADN en el hígado, estómago y sangre de las ratas tratadas con PTS en ninguna de las dosis ensayadas y en ninguno de los sexos. Del mismo modo, no se encontraron cambios notables en la frecuencia de sitios sensibles a Endo III o FPG en ningún tejido evaluado (Cascajosa-Lira et al., 2021).

Estos resultados sugieren que el PTS no provoca daños significativos en el ADN en los sitios sensibles a las enzimas reparadoras de ADN evaluadas, indicando ausencia de genotoxicidad en las condiciones ensayadas.

Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con BSE rico el glucorafanina (precursor del SFN) a dosis de hasta 10 g/kg de peso corporal no altera las proporciones de PCE/RBC significativamente en el ensayo de MN en médula ósea de ratón. Esto indica que el BSE no fue citotóxico para la médula ósea tras la exposición oral. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de MN entre todos los grupos de dosis (2,5-5,0-10,0 g/kg) y los grupos de control negativo ( $p > 0.05$ ). La frecuencia de MN en los grupos de control positivo, tanto machos como hembras, fue significativamente mayor que en el grupo de control negativo ( $p < 0.05$ ), lo que indica la validez del ensayo (Zhou et al., 2015).

Para asegurar la validez de los resultados negativos de genotoxicidad en estudios *in vivo*, es fundamental demostrar analíticamente la presencia de los compuestos ensayados en el tejido diana. En este sentido, Mellado-García et al. (2016) demostraron la presencia de metabolitos de PTSO en el tejido diana, lo cual valida sus resultados y confirma que el compuesto fue metabolizado y alcanzó los tejidos de interés sin ejercer ningún efecto tóxico. Por otro lado, Cascajosa-Lira et al. (2021) demostraron efectos citotóxicos de PTS en la médula, subrayando que el compuesto llegó correctamente al tejido diana sin producir efectos genotóxicos.

En contraste, Zhou et al. (2015) no realizaron estudios analíticos para confirmar la presencia de SFN en los tejidos a pesar de haber obtenido resultados negativos en sus ensayos de genotoxicidad. Esta omisión plantea dudas sobre la interpretación de los resultados, ya que, sin la confirmación analítica, no se puede asegurar que la ausencia de efectos tóxicos se deba realmente a la no toxicidad del compuesto y no a una falta de exposición efectiva de los tejidos al mismo.

#### Toxicidad aguda y subcrónica

Se han realizado estudios subcrónicos de 90 días en ratas para evaluar los efectos del PTSO (Cascajosa-Lira et al., 2020) y PTS (Cascajosa-Lira et al., 2022), a dosis de hasta 55 mg/kg, así como un estudio de 30 días con extracto de brócoli rico en glucorafanina (BSE) a una dosis de 3 g/kg (Zhou et al., 2015).

El estudio de toxicidad oral aguda del PTSO en ratas determinó que

una dosis de 2000 mg/kg fue letal en 24 horas, causando inflamación en intestino e hígado, con necrosis hepática y enteritis severa. A 175 mg/kg también resultó letal, aunque mostrando daños histológicos menos intensos, mientras que la dosis de 55 mg/kg fue tolerada, estableciendo este valor como la dosis máxima tolerada (DMT) (Llana-Ruiz Cabello et al., 2015).

El estudio de toxicidad oral subcrónica del PTSO en ratas no reveló muertes no programadas ni signos clínicos relevantes atribuibles al compuesto. No se observaron diferencias significativas en el aumento de peso corporal, consumo de alimentos y agua, así como en la eficiencia del consumo de alimentos entre los grupos control y tratados. Los parámetros hematológicos y bioquímicos no indicaron signos de toxicidad. Tampoco se detectaron patologías visibles durante la necropsia, ni alteraciones en los pesos de los órganos, y los exámenes histopatológicos no mostraron diferencias en comparación con el grupo control. Por todo esto, el PTSO no presentó efectos tóxicos subcrónicos significativos a las dosis evaluadas (Cascajosa-Lira et al., 2020).

El estudio de toxicidad aguda del PTS en ratas estableció la  $DL_{50}$  en 550 mg/kg y la DMT en 175 mg/kg, ya que esta última dosis administrada por sonda gástrica no causó muerte ni lesiones clínicas (Cascajosa-Lira et al., 2022).

El estudio de toxicidad subcrónica del PTS a 55 mg/kg en ratas no mostró alteraciones en la marcha, postura, movimientos o comportamiento. Los exámenes oftalmológicos tampoco revelaron anomalías. Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal, ganancia de peso, ingesta de alimentos o eficiencia de conversión de alimentos. En hematología y bioquímica clínica, no hubo cambios relevantes. Las necropsias y el peso de los órganos no mostraron diferencias significativas, y la histopatología no reveló características patológicas en los órganos evaluados, incluidos el sistema gastrointestinal, respiratorio, linfático, urinario, circulatorio, nervioso, musculoesquelético y reproductivo. En resumen, la administración subcrónica de PTS no produjo toxicidad en ratas a las dosis estudiadas (Cascajosa-Lira et al., 2022).

En cuanto al SFN, existen pocos estudios sobre su toxicidad aguda y subcrónica. Scola et al. (2017) detectaron una toxicidad severa, manifestada en sedación profunda, ataxia, ptosis y temblores en ratones expuestos a dosis altas de SFN administradas por vía intraperitoneal. En este estudio, una dosis de 300 mg de SFN/kg provocó la muerte de todos los animales en las primeras tres horas. Dosis de 250 mg/kg causaron síntomas similares, con la muerte de siete de doce ratones en cuatro horas. A 200 mg/kg, todos los animales mostraron sedación y ptosis, y seis de doce murieron durante la primera noche. A dosis menores, como 150 mg/kg, la sedación persistió, pero no hubo mortalidad. Además, los autores calcularon la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) en 212,67 mg/kg.

Por otro lado, Zhou et al. (2015) estudiaron los efectos de BSE en ratas expuestas oralmente durante 30 días a una dosis de 3 g/kg/día (equivalente a 390 mg/kg/día de glucorafanina, precursor de SFN). No se observó mortalidad ni efectos clínicos adversos relacionados con el tratamiento durante el periodo de estudio. Los animales mantuvieron actividades y crecimiento normales, y los pesos corporales no presentaron diferencias significativas entre los grupos tratados con SFN y los grupos control. Hubo una ligera disminución en el consumo de alimentos en los machos de dosis alta, asociada con un aumento en la eficiencia alimentaria, lo que mantuvo la ganancia de peso corporal similar a la de los grupos de control. Se observaron variaciones menores en los parámetros de hematología y química clínica, pero dentro del rango de control histórico, sin una relación clara de dosis-respuesta. Los parámetros de química clínica mostraron cambios mínimos dentro del rango de control histórico del laboratorio, sin diferencias significativas en los indicadores de toxicidad hepática o renal. Los pesos de los órganos aumentaron en los machos de dosis alta para el bazo y los riñones, mientras que el peso absoluto de los testículos se redujo ligeramente, aunque todos los valores se mantuvieron dentro del rango de control histórico. Las evaluaciones macroscópicas en la necropsia no revelaron anomalías, y las evaluaciones histológicas de varios

tejidos mostraron estructuras normales sin anomalías atribuibles al tratamiento con SFN.

### Toxicidad reproductiva sobre dos generaciones

El estudio de toxicidad reproductiva y multigeneracional del PTSO en ratones CD1 no mostró cambios clínicos ni mortalidad atribuida a su administración en tres fases (pre-apareamiento, gestación y lactancia) y a tres dosis diferentes (14, 28 y 55 mg/kg/día) (Cascajosa-Lira et al., 2024). Se observaron algunos cambios en el peso corporal y el consumo de alimentos, pero no estaban relacionados con el sexo ni eran dependientes de la dosis. Las dos generaciones parentales (F0, F1) mostraron un rendimiento reproductivo normal, y las crías (F1 y F2) nacieron sin anomalías. Los niveles séricos de hormonas sexuales (progesterona, testosterona, estradiol, hormona foliculoestimulante y hormona luteinizante) estaban en rangos normales. Aunque se observaron cambios significativos en el análisis de espermatozoides en la generación F0, no se encontraron variaciones en la generación F1 ni alteraciones en la fertilidad. Los pesos absolutos y relativos de los órganos, así como los estudios histopatológicos, no mostraron alteraciones significativas en ninguna de las generaciones.

El PTSO no se consideró tóxico para la reproducción ni con afectación sobre el desarrollo en ratones bajo las condiciones ensayadas. Estos resultados se alinean con estudios previos en ratas Sprague-Dawley, estableciendo un nivel sin efecto adverso observado (NOAEL)  $\geq 55$  mg/kg/día para animales parentales y sus crías. Este tipo de estudios, siguiendo directrices regulatorias, son importantes para la evaluación de riesgos, ya que examinan una amplia gama de parámetros relevantes y sensibles para identificar posibles efectos adversos, asegurando datos completos y fiables.

### Otros estudios

En un estudio sobre los efectos del PTSO en la disrupción endocrina (Cascajosa-Lira et al., 2023c), no se registraron cambios significativos en el peso de los órganos endocrinos de ratones, ni en los ciclos estrales de las hembras. No se observaron alteraciones significativas en los niveles séricos de hormonas sexuales en ratones macho. En hembras, hubo una disminución significativa en la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis y los receptores hormonales a ciertas dosis de PTSO, pero sin mostrar un efecto claro dependiente de la dosis y por lo tanto no atribuible al compuesto. Además, se encontró que el PTSO no interactúa eficazmente con los receptores de estrógenos y andrógenos según los análisis de acoplamiento molecular. Estos resultados indican que, aunque PTSO muestra ciertos efectos en la expresión génica y las hormonas, éstos no tienen relevancia toxicológica.

Además, se ha publicado una revisión que incluye varios estudios sobre la efectividad del PTSO y el PTS, entre otros extractos de *Allium*, administrados a animales de granja con el objetivo de mejorar la microbiota intestinal. Aunque las dosis administradas son más bajas que las evaluadas en los estudios toxicológicos, es importante destacar que ninguno de los animales mostró signos de toxicidad durante todo el periodo del ensayo (Guillamón et al., 2021).

### Conclusión

En conclusión, los estudios presentados en este trabajo proporcionan una evaluación exhaustiva, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad, estrés oxidativo, morfología celular, biotransformación, estudios agudos y subcrónicos y efectos reproductivos y de desarrollo de diversos OSCs. Los hallazgos indican que los derivados GSSP y CSSP no muestran actividad citotóxica ni genotóxica significativa *in vitro*, y que PTSO, PTS, GSSP, CSSP y SFN no presentan efectos genotóxicos *in vivo*. PTSO, PTS y SFN muestran un perfil seguro a largo plazo en ensayos subcrónicos *in vivo*, apoyando su perfil de seguridad para aplicaciones en el sector agroalimentario. Los estudios también subrayan la importancia de las rutas metabólicas de biotransformación, que pueden neutralizar los efectos dañinos de los compuestos parentales. En

general, los datos sugieren que la evaluación de estos compuestos debe considerar tanto sus efectos directos como los resultados de su metabolismo, para una comprensión completa de su toxicidad potencial y una correcta valoración de su seguridad para su aplicación en la industria alimentaria.

### Agradecimientos

Agradecimientos: Proyecto P18-TP247 de la Junta de Andalucía. Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades la concesión del contrato FPU (2019/01247).

### Bibliografía

1. Aguinaga-Casañas, M.A.; Mut-Salud, N.; Falcón-Piñeiro, A.; Alcaraz-Martínez, Á.; Guillamón, E.; Baños, A. *In Vitro* Antiparasitic Activity of Propyl-Propane-Thiosulfinate (PTS) and Propyl-Propane-Thiosulfonate (PTSO) from *Allium cepa* against *Eimeria acervulina* Sporozoites. *Microorganisms* 2022, 10(10), 2040. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102040>
2. Ariza, J.J.; García-López, D.; Sánchez-Nieto, E.; Guillamón, E.; Baños, A.; Martínez-Bueno, M. Antilisterial effect of a natural formulation based on citrus extract in ready-to-eat foods. *Foods* 2021, 10, 1475. <https://doi.org/10.3390/foods10071475>
3. Baralić, K.; Živanović, J.; Marić, Đ.; Božić, D.; Grahovac, L.; Antonijević Miljaković, E.; Čurčić, M.; Buha Djordjevic, A.; Bulat, Z.; Antonijević, B.; Đukić-Čosić, D. Sulforaphane—A Compound with Potential Health Benefits for Disease Prevention and Treatment: Insights from Pharmacological and Toxicological Experimental Studies. *Antioxidants* 2024, 13, 147. <https://doi.org/10.3390/antiox13020147>
4. Cascajosa Lira, A.; Prieto, A. I.; Baños, A.; Guillamón, E.; Moyano, R.; Jos, A.; Cameán, A. M. Safety assessment of propyl-propane-thiosulfonate (PTSO): 90-days oral subchronic toxicity study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 144, 111612. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111612>
5. Cascajosa-Lira, A.; Puerto, M.; Prieto, A.I.; Pichardo, S.; Díez-Quijada Jiménez, L.; Baños, A.; Guillamón, E.; Moyano, R.; Molina-Hernández, V.; Jos, Á.; Cameán, A.M. Genotoxicity Evaluation of Propyl-Propane-Thiosulfinate (PTS) from *Allium* genus Essential Oils by a Combination of Micronucleus and Comet Assays in Rats. *Foods* 2021, 10, 989. <https://doi.org/10.3390/foods10050989>
6. Cascajosa-Lira, A.; Pichardo, S.; Baños, A.; Guillamón, E.; Molina-Hernández, V.; Moyano, R.; Jos, A.; Cameán, A. M. Acute and subchronic 90-days toxicity assessment of propyl-propane-thiosulfinate (PTS) in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 161, 112827. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112827>
7. Cascajosa-Lira, A.; Medrano-Padial, C.; Prieto, A.I.; Baños, A.; de la Torre, J.M.; Jos, A.; Cameán, A.M. Genotoxicity evaluation of two derived products from *Allium* extracts: s-propylmercaptocysteine and s-propyl mercaptogluthathione. *Food Biosci.* 2023a, 53, 102671. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102671>
8. Cascajosa-Lira, A.; Medrano-Padial, C.; Pichardo, S.; de la Torre, J.M.; Baños, A.; Jos, A.; Cameán, A.M. Identification of *in vitro* metabolites of an *Allium* organosulfur compound and environmental toxicity prediction as part of its risk assessment. *Environ. Res.* 2023b, 229, 116001. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116001>
9. Cascajosa-Lira, A.; Guzmán-Guillén, R.; Baños Arjona, A.; Aguinaga-Casañas, M. A.; Ayala-Soldado, N.; Moyano-Salvago, M. R.; Molina, A.; Jos, Á.; Cameán, A. M.; Pichardo, S. Risk assessment and environmental consequences of the use of the *Allium*-derived compound propyl-propane thiosulfonate (PTSO) in agrifood applications. *Environ. Res.* 2023c, 236, 116682. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116682>

10. Cascajosa-Lira, A.; Guzmán-Guillén, R.; Pichardo, S.; Baños, A.; de la Torre, J.M.; Ayala-Soldado, N.; Moyano-Salvago, M.R.; Ortiz-Jaraba, I.; Cameán, A.M.; Jos, A. Two-Generation Toxicity Study of the Antioxidant Compound Propyl-Propane Thiosulfonate (PTSO). *Antioxidants* 2024, 13, 350. <https://doi.org/10.3390/antiox13030350>
11. European Commission. (2012). Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012 adopting the list of flavouring substances provided for by Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) No 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC.
12. European Commission. (2017). Commission Implementing Regulation (EU) 2017/62 of 14 December 2016 concerning the authorisation of certain compounds as feed additives for all animal species.
13. García-Nicolás, M.; Pastor-Belda, M.; Campillo, N.; Rodríguez-Sojo, M.J.; Ruiz-Alagón, A.J.; Hidalgo-García, L.; Abad, P.; de la Torre, J.M.; Guillamón, E.; Baños, A.; Gálvez, J.; Viñas, P.; Arroyo-Manzanares, N. Analytical platform for the study of metabolic pathway of propyl propane thiosulfonate (PTSO) from *Allium* spp. *Foods* 2023, 12, 823. <https://doi.org/10.3390/foods12040823>.
14. Guillamón, E.; Andreo-Martínez, P.; Mut-Salud, N.; Fonollá, J.; Baños, A. Beneficial effects of organosulfur compounds from *Allium cepa* on gut health: A systematic review. *Foods* 2021, 10, 1680. <https://doi.org/10.3390/foods10081680>
15. Guillamón, E.; Mut-Salud, N.; Rodríguez-Sojo, M.J.; Ruiz-Malagón, A.J.; Cuberos-Escobar, A.; Martínez-Férez, A.; Rodríguez-Nogales, A.; Gálvez, J.; Baños, A. *In Vitro* Antitumor and Anti-Inflammatory Activities of *Allium*-Derived Compounds Propyl Propane Thiosulfonate (PTSO) and Propyl Propane Thiosulfinate (PTS). *Nutrients* 2023, 15(6), 1363. <https://doi.org/10.3390/nu15061363>
16. Llana Ruiz-Cabello, M.; Puerto, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Jos A.; Cameán, A.M. Estudio *in vitro* de la viabilidad de células Caco-2 en presencia de un componente de aceite esencial de ajo. *Rev. Toxicol.* 2013, 30, 144-148.
17. Llana-Ruiz-Cabello, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Puerto, M.; Pichardo, S.; Moreno, F. J.; Baños, A.; Nuñez, C.; Guillamón, E.; Cameán, A. M. Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging. *Food Chem. Toxicol.* 2015, 82, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.027>.
18. Llana-Ruiz-Cabello, M.; Pichardo, S.; Jiménez-Morillo, N.T.; Abad, P.; Guillamón, E.; González-Vila, F.J.; Cameán, A.M.; González-Pérez, J.A. Characterisation of a bio-based packaging containing a natural additive from *Allium* spp. using analytical pyrolysis and carbon stable isotopes. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2016, 120, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.05.021>.
19. Mellado-García, P.; Maisanaba, S.; Puerto, M.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Prieto, A. I.; Marcos, R.; Pichardo, S.; Cameán, A. M. Genotoxicity assessment of propyl thiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging. *Food Chem. Toxicol.* 2015, 86, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.011>.
20. Mellado-García, P.; Puerto, M.; Prieto, A. I.; Pichardo, S.; Martín-Cameán, A.; Moyano, R.; Blanco, A.; Cameán, A. M. Genotoxicity of a thiosulfonate compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging: *In vivo* comet assay and micronucleus test. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2016, 800–801, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.03.004>.
21. Mellado-García, P.; Maisanaba, S.; Puerto, M.; Prieto, A. I.; Marcos, R.; Pichardo, S.; Cameán, A. M. *In vitro* toxicological assessment of an organosulfur compound from *Allium* extract: Cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity studies. *Food Chem. Toxicol.* 2017, 99, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.007>.
22. Mylona, K.; Garcia-Cela, E.; Sulyok, M.; Medina, A.; Magan, N. Influence of two garlic-derived compounds, propyl propane thiosulfonate (PTS) and propyl propane thiosulfinate (PTSO), on growth and mycotoxin production by *Fusarium* species. *In Vitro and in Stored Cereals. Toxins.* 2019, 11(9), 495. <https://doi.org/10.3390/toxins11090495>.
23. Nicastro, H.L.; Ross, S.A.; Milner, J.A. Garlic and onions: Their cancer prevention properties. *Cancer Prev. Res.* 2015, 8, 181–189. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0172>
24. Poojary, M. M.; Putnik, P.; Bursac Kovacevic, D.; Barba, F. J.; Lorenzo, J. M.; Dias, D. A.; Shpigelman, A. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. *J. Food Compos. Anal.* 2017, 61, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.007>.
25. Putnik, P.; Gabric, D.; Roohinejad, S.; Barba, F. J.; Granato, D.; Mallikarjunan, K.; Lorenzo, J. M.; Bursac Kovacevic, D. An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Food Chem.* 2019, 276, 680–691. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.068>.
26. Rabelo-Ruiz, M.; Ariza-Romero, J. J.; Zurita-González, M. J.; Martín-Platero, A. M.; Baños, A.; Maqueda, M.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Peralta-Sánchez, J. M. *Allium*-based phytobiotic enhances egg production in laying hens through microbial composition changes in ileum and cecum. *Animals* 2021, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani11020448>.
27. Ramirez, D.A.; Locatelli, D.A.; González, R.E.; Cavagnaro, P.F.; Camargo, A.B. Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions. *J. Food Compos. Anal.* 2017, 61, 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.012>.
28. Ribeiro-Santos, R.; Andrade, M.; Melo, N.R.; de Sanches-Silva, A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, 61, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>.
29. Sorlozano-Puerto, A.; Albertuz-Crespo, M.; Lopez-Machado, I.; Ariza-Romero, J.J.; Baños-Arjona, A.; Exposito-Ruiz, M.; Gutierrez-Fernandez, J. *In vitro* antibacterial activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate derived from *Allium* spp. against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. *Biomed Res. Int.* 2018, 2018, 7861207. <https://doi.org/10.1155/2018/7861207>.
30. Teshika, J.D.; Zakariyyah, A.M.; Zaynab, T.; Zengin, G.; Rengasamy, K.R.; Pandian, S.K.; Fawzi, M.M. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): A systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, 59, S39–S70. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1499074>.
31. Teyssier, C., Siess, M.H., 2000. Metabolism of dipropyl disulfide by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.* 28 (6), 648–654

# Conocimiento, actitudes y prácticas sobre plaguicidas en estudiantes de una Universidad del Perú

Aroni-Ccanri B. M.<sup>1</sup> Curasi-Curasi V.<sup>1</sup> Zolorzano-Aitara R. M.<sup>1</sup> Cardona - Rivero A.<sup>1</sup> Moreyra - Pachas C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Cusco, Cusco, Perú, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica.

**Resumen:** El uso de plaguicidas en la agricultura es esencial para controlar plagas, pero su aplicación incorrecta puede generar efectos negativos en la salud y el ambiente. El objetivo de este estudio fue determinar y evaluar el nivel de conocimiento, actitudes y prácticas sobre el uso de plaguicidas en estudiantes de Agronomía de una Universidad del Cusco, Perú. Para lo cual se realizó un estudio de diseño descriptivo, prospectivo, transversal y correlacional. Los datos se obtuvieron a través de cuestionarios validados, en una muestra de 100 estudiantes. Se utilizó estadística descriptiva. Los resultados en cuanto al nivel de conocimiento un 70% de la población tiene un nivel moderado, 20% nivel alto y 10% nivel bajo. Mientras, que un 84% tiene actitud aceptable, 13% actitud positiva y 3% actitud negativa. Además, el 64% tiene buenas prácticas, 33% prácticas aceptables y 3% malas prácticas. En conclusión se observó, que los resultados sobre el conocimiento, actitudes y prácticas de los estudiantes de la Escuela Profesional de Agronomía en relación con el uso adecuado de plaguicidas muestran un panorama mixto. Puesto que muchos de ellos demuestran conocimientos aceptables, también existen deficiencias en su comprensión y prácticas relacionadas con la seguridad en el manejo de plaguicidas.

**Palabras clave:** conocimientos, actitudes, prácticas, plaguicidas, agronomía.

**Abstract:** *Knowledge, attitudes and practices regarding pesticides in students from a University in Peru.*

The use of pesticides in agriculture is essential to control pests, but their incorrect application can generate negative effects on health and the environment. The objective of this study was to determine and evaluate the level of knowledge, attitudes and practices on the use of pesticides in Agronomy students of a university in Cusco, Peru. For this purpose, a descriptive, prospective, cross-sectional and correlational study was carried out. Data were obtained through validated questionnaires in a sample of 100 students. Descriptive statistics were used. The results regarding the level of knowledge showed that 70% of the population has a moderate level, 20% a high level and 10% a low level. Meanwhile, 84% have an acceptable attitude, 13% have a positive attitude and 3% have a negative attitude. In addition, 64% have good practices, 33% acceptable practices and 3% bad practices. In conclusion, it was observed that the results on the knowledge, attitudes and practices of the students of the Professional School of Agronomy in relation to the proper use of pesticides show a mixed picture. Since many of them demonstrate acceptable knowledge, there are also deficiencies in their understanding and practices related to the safe handling of pesticides.

**Keywords:** knowledge, attitudes, practices, pesticides, agronomy.

## Introducción

La agricultura es fundamental en Perú, donde se practica de manera intensiva y representa una de las actividades productivas de mayor relevancia social y cultural. Las familias campesinas dedican sus esfuerzos a la siembra de cultivos tradicionales como la papa, el maíz y otros tubérculos, granos y cereales, los cuales constituyen la base alimentaria de la región. (Montoro, Moreno, Gomero, Reyes ; 2009). A pesar de que estos productos prometen una mayor protección a la planta, los riesgos asociados al ambiente y a la salud humana han superado los beneficios, ocasionando enfermedades crónicas, neurodegenerativas, cáncer y malformaciones congénitas (Van Mael

Fabry 2010; Baldi, 2010; Meenakshi 2012; Wickerham, 2012). Un informe sobre el uso inadecuado de plaguicidas en Perú revela un aumento de intoxicaciones agudas en varias regiones, especialmente por exposición ocupacional. Hasta la semana epidemiológica 9 de 2023, se notificaron 388 casos, con mayor incidencia en Lambayeque y Amazonas. Las intoxicaciones afectan principalmente a jóvenes y adultos, con predominio de exposición oral y cutánea. Enfatizando la necesidad de mejores prácticas y políticas para minimizar los riesgos en salud y medio ambiente (DGE, 2023). Dentro de estos se encuentran las familias de triazinas, clorfenoxilo, derivados de urea, bupiridilol y glifosato que se utilizan como herbicidas. Por su parte, los organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretroides, etc. con acción insecticida y en el correspondiente a fungicidas, el pentaclorofenol, ditiocarbamatos, iprodiona, etc. (Negatu y otros, 2017) Complementando a esto, los profesionales agrícolas y los estudiantes de agronomía tienen un papel crucial en el manejo seguro de plaguicidas. Su formación es esencial para prevenir riesgos a la salud propia y de las comunidades, comprender estos riesgos les permite implementar prácticas seguras y educar a los agricultores en el uso responsable de estos productos, contribuyendo a reducir intoxicaciones, mejorar la salud pública y fomentar prácticas sostenibles agrícolas.

El objetivo de la presente investigación se centra en evaluar el nivel de conocimiento, actitudes y prácticas sobre el uso de plaguicidas y su toxicidad potencial en estudiantes de una universidad del Perú.

## Materiales y métodos

Estudio descriptivo y transversal, realizado durante el 2024, en estudiantes universitarios de agronomía en Cusco.

### Muestreo

La población total de encuestados fueron seleccionados por medio de un muestreo propositivo no intencional, para recabar información sobre el conocimiento, actitudes, prácticas y potencial toxicidad en la salud, por uso y aplicaciones de plaguicidas; se aplicó un instrumento tipo encuesta con preguntas con opción múltiple utilizando la escala Likert y preguntas abiertas. Para la evaluación y puntuación de preguntas sobre el nivel de conocimiento se utilizó una escala de puntuación: nivel bajo, moderado y alto; por otra parte, para la evaluación sobre las actitudes se consideró: actitud positiva, actitud aceptable y actitud negativa y para la evaluación de prácticas en relación con el uso de plaguicidas se consideró: buenas prácticas, prácticas aceptables y malas prácticas.

### Instrumento

La población total de encuestados fueron 100 estudiantes universitarios del 7° al 10° semestre de agronomía de una universidad del Perú. La encuesta se diseñó a partir de la revisión bibliográfica y teórica sobre antecedentes en las barreras y estrategias en la adopción del conocimiento que implican las aplicaciones de plaguicidas. También, se revisaron instrumentos de investigaciones especializadas en el área de los plaguicidas y sus afectaciones adversas en salud, posteriormente la encuesta fue validada por 3 expertos conocedores en el área. La aplicación de la encuesta a los participantes en el estudio, se realizó de forma individual y presencialmente con una duración aproximada de 15 minutos, lo cual se llevó a cabo en las instalaciones de la universidad.

### Mediciones

La encuesta incluyó 30 preguntas, divididas en características socio demográficas e información en general, conocimientos (15 preguntas

\*e-mail: 200909@unsaac.edu.pe

incluidas), actitudes (8 preguntas incluidas) y prácticas (7 preguntas), las cuales evaluarán el nivel de conocimiento, actitudes y prácticas en relación con el uso de plaguicidas e intoxicación, además de la identificación y comprensión de la perspectiva del estudiante sobre diversos aspectos de su experiencia en el ámbito de las labores agrícolas, la aplicación de los agroquímicos, las dificultades en su aplicación, las herramientas de protección y los daños en salud y ambiente. Se incluyeron preguntas: dicotómicas, de opción múltiple y abiertas.

### Análisis de la información

Se realizó un análisis descriptivo, el procesamiento y análisis de datos obtenidos en la encuesta se recuperó a través de una base de datos Microsoft Excel 2019 (versión 17.0), se utilizó tablas de frecuencia y porcentaje. Se realizó el análisis de datos con el software IBM SPSS Statistics (versión 29.0.2.0). Con los cuales se elaborarán las tablas de frecuencia y gráficos estadísticos de acuerdo a los objetivos planteados en la investigación, teniendo en cuenta que se cuenta con un nivel de confianza del 95%. Para identificar la asociación entre variables se utilizó la prueba de correlación Rho de Spearman: Relación del nivel de conocimiento con las actitudes y prácticas en el uso de plaguicidas.

### Consideraciones éticas

Se enfatizó a los participantes que la información obtenida sería estrictamente confidencial, conservando el anonimato al asignar sus iniciales a cada entrevistado. Así mismo, a fin de obtener su consentimiento informado, se reiteró el carácter voluntario y gratuito de su participación. Se les informó la finalidad y el uso que recibiría la información y su permiso para publicarlo.

### Resultados

De la población de estudios el 69% son varones y 31% mujeres, el 54% posee una experiencia en el campo agrícola menor a 5 meses mientras el 17% mayor a 26 meses. Una gran parte de los estudiantes, el 68%, realiza 4 horas diarias de práctica, lo que indica que la mayoría está comprometida con la formación práctica, aunque en un tiempo relativamente corto y un 2% supera las 12 horas diarias (Tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución del género, tiempo de experiencia y horas de práctica

Característica		
Género	n	%
Masculino	69	69
Femenino	31	31
Tiempo de experiencia		
< 5 meses	54	54
6-15 meses	18	18
16-25 meses	11	11
>26 meses	17	17
Horas de práctica por día		
4	68	68
8	27	27
12	3	3
>12	2	2

El 70% de los estudiantes se encuentra en un nivel moderado de conocimiento, el 20% tiene un nivel alto y el 10% de los estudiantes se ubica en un nivel bajo de conocimiento. (Tabla 2).

Del total de personas un 84% tiene una actitud aceptable hacia el uso adecuado de plaguicidas, Un 13% de los estudiantes muestra una

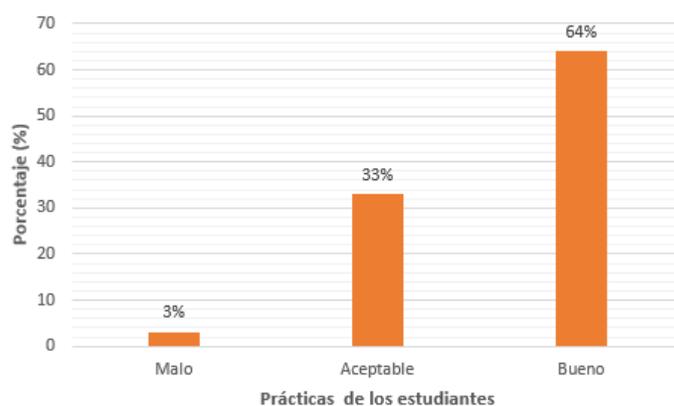
actitud positiva y el 3% de los estudiantes presenta una actitud negativa (Tabla 3). Los resultados de prácticas sobre el manejo de plaguicidas un 64% de los estudiantes lleva a cabo buenas prácticas en el manejo adecuado de plaguicidas, 33% se clasifica con prácticas aceptables, un 3% presenta malas prácticas (Figura 1).

**Tabla 2.** Nivel de conocimiento sobre el uso adecuado de plaguicidas

Nivel de conocimiento	N	Porcentaje (%)
Nivel bajo	10	10
Nivel moderado	70	70
Nivel alto	20	20
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Tabla 3.** Actitud sobre el uso adecuado de plaguicidas

	N	Porcentaje (%)
Actitud negativa	3	3
Actitud aceptable	84	84
Actitud positiva	13	13
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>



**Figura 1.** Práctica sobre el manejo de plaguicidas

### Discusión

Los datos obtenidos permitieron cumplir con el objetivo de determinar y evaluar el nivel de conocimiento, actitudes y prácticas sobre el uso de plaguicidas y el impacto de los plaguicidas en salud en los estudiantes universitarios. La investigación muestra que la mayoría de los estudiantes, el 76%, se encuentra en el rango de edad de 18 a 24 años, el 23% de los estudiantes tiene entre 24 y 30 años y solo el 1% de los estudiantes tiene más de 30 años. La tabla 1 muestra la distribución de la experiencia agrícola de los estudiantes universitarios, el 54%, tiene menos de 5 meses de experiencia agrícola, un 18% cuenta con una experiencia de 6 a 15 meses y un 11% de los estudiantes tiene entre 16 y 25 meses de experiencia, mientras que un 17% posee más de 26 meses de experiencia agrícola. Estos datos reflejan una diversidad en la experiencia entre los estudiantes, con una tendencia predominante hacia la inexperiencia en el ámbito agrícola. En un estudio similar que se realizó en trabajadores agrícolas (Barrientos, M. y Calvin F-Ayacucho, 2022) se encontró que la experiencia agrícola de los agricultores, el 90% trabaja 8 horas por día, mientras que un 10% trabaja 12 horas al día, esto se diferencia de nuestro estudio por el tipo de población, los estudiantes tienden a realizar prácticas en el campo mientras que los trabajadores se dedican a la agricultura. Seguidamente, la tabla presenta la distribución de las horas de práctica en campo agrícola de los estudiantes, donde el 68%, realiza 4 horas diarias de práctica, lo que indica que la mayoría está comprometida con la formación práctica, aunque en un tiempo relativamente corto. Un 27% de los estudiantes dedica 8 horas diarias, sugiriendo que un grupo considerable está invirtiendo más tiempo en su experiencia práctica. Solo un 3% de los estudiantes tiene 12 horas diarias de práctica, y un 2% supera las 12 horas diarias. En el estudio de (Barrientos, M. y Calvin F- Ayacucho,

2022) se encontró que la experiencia agrícola de los agricultores de Sancos, el 90% trabaja 8 horas por día, mientras que un 10 % trabaja 12 horas al día, esto se diferencia de nuestro estudio por el tipo de población, los estudiantes tienden a realizar prácticas en el campo mientras que los trabajadores se dedican a la agricultura.

En relación con el conocimiento sobre el manejo de los plaguicidas, la tabla N.º 2 muestra que se obtuvo un 70% de los estudiantes, tiene un nivel moderado de conocimiento, lo que sugiere que poseen una comprensión básica, aunque requieren más formación sobre los efectos y aplicaciones de los plaguicidas, así como sobre alternativas sostenibles. Un 20% cuenta con un alto nivel de conocimiento, incluyendo aspectos técnicos y efectos a largo plazo en la salud y el medio ambiente, aunque este grupo es minoritario y no garantiza que la mayoría esté preparada para un manejo responsable. Por último, el 10% de los estudiantes presenta un bajo nivel de conocimiento, lo que es preocupante, ya que puede llevar a errores que afectan su salud y el entorno, por ende es crucial implementar estrategias educativas para mejorar la comprensión y habilidades de este grupo en el manejo de plaguicidas. En el estudio de (Barrientos, M. y Calvin F-Ayacucho, 2022) se importa que el 72% de los trabajadores agrícolas de Ayacucho, poseía un alto nivel de conocimiento sobre el uso de plaguicidas. Esta diferencia indica que los estudiantes, aunque cuentan con una comprensión básica sobre el manejo de plaguicidas, no alcanzan el mismo nivel de conocimiento que los trabajadores agrícolas, quienes, al estar más inmersos en la práctica, desarrollan un entendimiento más sólido sobre el uso y las implicaciones de estos productos. Por otro lado, la investigación realizada por (Castillo-Lima, 2014) demuestra que existe una relación significativa y positiva entre la conducta ambiental y el conocimiento de plaguicidas agrícolas en estudiantes de ingeniería ambiental; aunque en el presente estudio no se analiza directamente la conducta ambiental, se observa que solo el 20% de los estudiantes reporta un alto nivel de conocimiento, lo que sugiere un potencial impacto negativo en su conducta hacia el manejo adecuado de plaguicidas.

En cuanto a las actitudes de los estudiantes universitarios frente al manejo de plaguicidas, la tabla N.º 3 nos muestra que el 84% de los estudiantes tiene una actitud aceptable hacia el uso adecuado de plaguicidas, lo que indica que la mayoría comprende la importancia de manejarlos de manera responsable, un aspecto positivo para su formación en agronomía. Sin embargo, al calificar la actitud como "aceptable" y no "positiva", se evidencia la necesidad de mejorar su compromiso y comprensión sobre las prácticas seguras. Un 13% de los estudiantes muestra una actitud positiva, lo que refleja su disposición a adoptar prácticas responsables, pero este porcentaje es bajo y requiere esfuerzos para fortalecer esta mentalidad y promover una cultura de seguridad. Por último, el 3% presenta una actitud negativa hacia el uso adecuado de plaguicidas, lo cual es preocupante, ya que puede implicar riesgos si estos estudiantes manipulan plaguicidas sin la debida formación. Por otro lado, el estudio de (Ascue Pallani-Lima, 2024) resalta que la importancia de un conocimiento y actitud sólida es crucial para garantizar un manejo responsable de plaguicidas, reducir riesgos para la salud y el medio ambiente, y contribuir a la formación de profesionales competentes en agronomía.

Finalmente, referido a los datos sobre las prácticas de los estudiantes universitarios frente al manejo de los plaguicidas, que se muestra en la figura N.º 1, se demostró que el 64% de los estudiantes implementa buenas prácticas en el manejo adecuado de plaguicidas, lo que evidencia un sólido nivel de formación y conciencia sobre la importancia de estas de seguridad en su futura práctica profesional. Un 33% de los estudiantes tiene prácticas aceptables, reconociendo la relevancia del manejo de plaguicidas, aunque sus métodos pueden no ser óptimos; Es vital que reciban más educación y orientación para mejorar sus habilidades. Finalmente, el 3% presenta malas prácticas en el manejo de plaguicidas, un porcentaje bajo pero preocupante, ya que estas prácticas aumentan el riesgo de efectos adversos en la salud y el medio ambiente. El estudio de (Choquepuri, Serrano-Cusco, 2017)

donde se evaluó el riesgo ambiental del plaguicida en suelos dedicados al cultivo de papa, resaltan la importancia del manejo adecuado de plaguicidas para prevenir la contaminación del medio ambiente; Por lo tanto, la educación en prácticas seguras es fundamental no solo para proteger la salud humana, sino también para salvar el medio ambiente, destacando la relevancia de los programas educativos en agronomía.

## Conclusión

El estudio concluye que los estudiantes de Agronomía presentan conocimientos aceptables sobre el uso de plaguicidas, aunque persisten deficiencias en actitudes y prácticas seguras. Esto evidencia la necesidad de programas educativos que fortalezcan su formación teórica y práctica, promoviendo un manejo responsable de estos productos para minimizar riesgos en salud y medio ambiente. Además, se resalta la importancia de integrar estrategias educativas que alineen el conocimiento con la implementación de buenas prácticas agrícolas.

## Bibliografía

- Ascue B. Evaluación de riesgo ambiental y toxicología en el proceso de registros de plaguicidas de uso agrícola. [Internet]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2024 [citado 8 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/6167/ascue-pallqui-bereli.pdf>
- Baldi, I., Gruber, A., Rondeau, V., Lebailly, P., Brochard, P. y Fabrigoule, C. (2010). Efectos neuroconductuales de la exposición prolongada a pesticidas: resultados del seguimiento de 4 años del estudio PHYTONER. *Medicina ocupacional y ambiental*, 68 ( 2), 108–115 . <http://dx.doi.org/10.1136/oem.2009.047811>
- Barrientos Medina A, Calvin Flores W. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre el uso de plaguicidas en trabajadores agrícolas de las comunidades rurales del distrito de Sancos, provincia de Lucanas, Ayacucho. [Internet]. Universidad María Auxiliadora; 2024 [citado 27 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/1518/TESIS%20BARRIENTOS-CALVAY.pdf>
- Choquepuri Champi M, Serrano Vargas M. Riesgo ambiental de plaguicidas en suelos destinados al cultivo de papa en el sector de Huatata-Chincheros-Cusco. [Tesis]. Cuzco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco; 2017.
- Dirección General de Epidemiología (DGE). (2023). Sala situacional de plaguicidas, semana epidemiológica 9 - 2023. [Internet]. Lima: Ministerio de Salud del Perú. [citado 4 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2023/SE09/plaguicidas.pdf>
- Meenakshi, S., Bhawana, P., Anita, M., S. y VK, G. (2012). Una breve reseña sobre cómo los pesticidas afectan la salud humana. *Revista internacional de medicina herbaria ayurvédica*, 5 , 935–946. Disponible en: <http://www.interscience.org.uk/index.php/ijahm/article/view/362>
- Montoro Y, Moreno R, Gomero L, Reyes M. Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. octubre de 2009; 26(4):466-72.
- Negatu, B., Kromhout, H., Mekonnen, Y. y Vermeulen, R. (2017). Exposición ocupacional a pesticidas y salud respiratoria: un estudio transversal a gran escala en tres sistemas agrícolas comerciales en Etiopía. *Thorax*, 72 (6), 498–499 . <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208924>
- Van Mael Fabry, G., Lantin, AC, Hoet, P., Lison, D. (2010). Leucemia infantil y exposición ocupacional de los padres a pesticidas: una revisión sistemática y un metanálisis. *Cancer Causes Control* 21 (6), 787–809. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9516-7>

10. Wickerham, EL, Lozoff, B., Shao, J., Kaciroti, N., Xia, Y., y Meeker, JD (2012). Reducción del peso al nacer en relación con las mezclas de pesticidas detectadas en la sangre del cordón umbilical de los bebés nacidos a término . *Environment International* , 47 , 80–85 . <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.06.007>

# Evaluación de la degradación del cannabis

Tejedor Tejada E.<sup>1</sup> ; Benedí González J.<sup>2</sup>; Moro Aguado J.<sup>3</sup> y Tejedor Muñoz JM.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Farmacia Hospitalaria. Hospital General de Segovia

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

<sup>3</sup> Área de Sanidad. Delegación del Gobierno en Castilla y León.

**Resumen:** El objeto estudio fue conocer la pérdida o ganancia de riqueza de los cannabinoides  $\Delta$ -9-Tetrahidrocannabinol (THC) y Cannabinol (CBN) de los alijos de cannabis decomisados y almacenados durante 3 y 4 años para determinar las mejores condiciones de almacenamiento mediante la obtención de información referente a la degradación del cannabis y a la par garantizar el proceso judicial respecto las actuaciones sanitarias vinculadas a los decomisos. El estudio se efectuó con muestras por partida doble en condiciones ambientales específicas y también en muestras depositadas en el frigorífico con el fin de reproducir el escenario habitual y su posible alternativa. Se analizaron mediante cromatografía de gases los cannabinoides referidos. Los resultados obtenidos fueron: Las muestras almacenadas en condiciones ambientales, situados en el semisótano y sexta planta del edificio, tuvieron una progresiva pérdida porcentual de THC, estadísticamente significativa que alcanzó el 53% y 59,37% a los tres y cuatro años, siendo la descomposición del THC más intensa durante el primer año. Similares resultados pero ascendentes se hallaron en la concentración de CBN. Las muestras del frigorífico experimentaron un descenso de THC y ascenso de CBN más sostenido (30,94 % de THC a los cuatro años). En conclusión el estudio recoge el porcentaje de pérdida de THC en nuestra Unidad y ratifica la influencia de la luz y la temperatura en el proceso de degradación del cannabis junto con el tiempo de permanencia de almacenamiento. Por ello, el modelo de depósito de las drogas incautadas debe ser un área de escasa o nula luminosidad y temperatura baja, a ser posible frigorífico en aquellas situaciones o muestras que se prevean litigiosas, con controles periódicos anuales de seguimiento.

**Palabras claves:** cannabis, degradación, almacenamiento

## Abstract: Assessment of cannabis degradation

The purpose of the study was to determine the loss or gain in richness of the cannabinoids  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabinol (CBN) in cannabis seized and stored for 3 and 4 years in order to determine the best storage conditions by obtaining information on the degradation of cannabis and at the same time to guarantee the judicial process with respect to the health actions linked to the seizures. The study was carried out on double samples under specific environmental conditions and also on samples stored in the refrigerator in order to reproduce the usual scenario and its possible alternative. The cannabinoids referred to were analysed by gas chromatography. The results obtained were: The samples stored in ambient conditions, located in the semi-basement and sixth floor of the building, had a statistically significant progressive percentage loss of THC, reaching 53% and 59.37% after three and four years, with the THC decomposition being more intense during the first year. Similar but increasing results were found for CBN concentration. The samples from the fridge experienced a more sustained THC decrease and CBN increase (30.94 % THC at four years). In conclusion, the study shows the percentage of THC loss in our Unit and confirms the influence of light and temperature on the degradation process of cannabis together with the storage time. Therefore, the storage model for seized drugs should be an area with little or no light and low temperature, preferably refrigerated in those situations or samples that are expected to be litigious, with regular annual monitoring controls.

**Keywords:** cannabis, degradation, storage

## Introducción

La planta *Cannabis sativa* produce más de 750 compuestos naturales

de diferentes clases químicas. Entre los principales compuestos se han identificado, hasta la fecha, 100 cannabinoides, compuestos orgánicos del grupo terpenofenólicos (Hartsel et al.2016). La *Cannabis sativa* no produce delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC/THC), Cannabidiol (CBD), Cannabigerol (CBG), sino que los cannabinoides se encuentran en sus formas ácidas, precursores de ácido carboxílico, Ácido  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinóico ( $\Delta$ 9-THCA), ácido cannabidiolico (CBDA), y ácido cannabigerólico (CBGA) y en este estado no tienen efecto psicoactivo por lo que requieren descarboxilarse (aplicación de calor) para transformarse en su forma activa, también ocurre lentamente un proceso de degradación con el paso del tiempo en condiciones ambientales, aunque la velocidad aumenta con la temperatura, el  $\Delta$ 9-THC sufre oxidación a Cannabinol (CBN), indicador químico de prolongadas condiciones de almacenamiento.

El  $\Delta$ 9-THC es una molécula muy inestable a temperatura ambiente y su degradante primario es CBN (Harvey, 1990). La estabilidad del  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) ha sido investigada desde hace décadas en diversos estudios, entre otros autores (Lerner 1969;Liskow 1970; Turner et al 1973; Coffman y Gentner 1974; Fairbain et al. 1976; Lewis y Turner 1978 ; Turner y ElSohly 1979; Ross y ElSohly, 1997) en productos de cannabis con concentraciones muy diferentes, más bajas, a las actuales, y con metodología variada que dificulta la comparación de resultados.

En España, las Unidades de Sanidad que gestionan los procesos de recepción, análisis y destrucción de drogas ilícitas, deben de conocer cuál es el porcentaje de degradación de las drogas depositadas bajo su responsabilidad a fin de responder a las variadas y legítimas solicitudes de las partes implicadas en los procesos judiciales.

El uso de productos de cannabis de alta potencia permite hacer estudios en periodos largos para mejorar el conocimiento del proceso de degradación.

El objeto del presente trabajo de investigación fue evaluar y establecer la pérdida o ganancia de riqueza de los cannabinoides  $\Delta$ -9-Tetrahidrocannabinol (THC) y Cannabinol (CBN) de los alijos decomisados y depositados en las dependencias habituales en situaciones reales de almacenamiento durante dos periodos de 3 y 4 años, y a su vez, estos últimos se compararon con muestras almacenadas en frigorífico. Esta comparación permitirá planificar y determinar las mejores condiciones de conservación mediante la obtención de información referente a la degradación del cannabis y a la par garantizar el proceso judicial ó administrativo respecto las actuaciones sanitarias vinculadas a los decomisos que se pudieran plantear en un futuro.

## Material y métodos

El laboratorio del Área de Sanidad de la Delegación del Gobierno en la Comunidad Autónoma de Castilla y León es el laboratorio oficial para el análisis de drogas ilícitas, tanto en procesos judiciales como en procesos administrativos sancionadores, en ese ámbito territorial.

### 1. Recogida del material para el estudio

Se emplearon para el estudio de degradación 52 muestras de cannabis (marihuana) de diferentes concentraciones iniciales de THC. Las muestras se conservaron por partida doble durante un periodo prolongado de 3 y 4 años, tipo 1 y tipo 2. Las muestras tipo 1, fueron 26 muestras de marihuana, almacenadas los años 2018 a 2020 en la planta sexta del edificio que alberga el depósito. Las muestras tipo 2 fueron 26 muestras de marihuana depositadas los años 2017 a 2020 en el almacén del semisótano del edificio. Las muestras tipo 1 y tipo 2 se conservaron

\*e-mail: edutejedor91@gmail.com

en condiciones ambientales habituales de almacenamiento (temperatura ambiente y luminosidad); las muestras tipo 2 se compararon con muestras de la misma procedencia y fueron depositadas en un frigorífico en frascos de cristal cerrados y con silica gel.

2. Equipos.

Balanza de precisión METTLER TOLEDO AE200S, (+/-0,1mg precisión). Cromatógrafo de gases (GC) detector de ionización de llama (FID) modelo HP 7890A e inyector automático modelo G4513A CN 10430050 interfaz del equipo “Chemstation versión B.04.03”.

3. Método de análisis

3.1. Toma de muestra y preparación

Las muestras de vegetales estaban secas y preparadas para su consumo, fueron homogenizadas y reducidas a polvo fino con mortero.

Para el proceso de determinación cuantitativa, se empleó la metodología descrita en el manual publicado para el cannabis (UNOC, 2010). En primer lugar se pesan 10 mg ± 0,1. Para minimizar los errores asociados al error de la balanza, se utiliza el método de doble pesada por el que se toman dos porciones de la sustancia y se pesan independientemente.

Cada una de las porciones pesadas se lleva a un matraz de 10 ml (+/-0,025), al que se añade etanol hasta su enrase.

A continuación, se realiza la homogenización mediante agitación magnética durante veinte minutos y se procede a su filtrado con filtro EPA de 0.45 micrómetros de poro, para eliminar impurezas y proteger la columna del equipo.

3.2 Análisis y comparación muestras

El estudio se efectuó en las 26 muestras por partida doble en muestras ambientales (6ª planta y semisótano) y en frigorífico con el fin de evaluar la degradación del THC. Se analizaron mediante un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama FID la concentración de THC y CBN de las muestras ambientales (planta sexta) durante 3 años (0, 3,6,9,18,24,31 y 36 meses) y las muestras ambientales (semisótano) y sus homónimas depositadas en el frigorífico a los 18,36 y 48 meses.

La obtención de los estadísticos que resumen la pérdida porcentual relativa de THC se calcula a partir de la creación de una variable, muestra a muestra, mediante la fórmula:

$$*Pérdida\ relativa\ THC = (THC\ 2^\circ\ análisis - THC\ 1^\circ\ análisis) \times 100 / THC\ 1^\circ\ análisis$$

A partir del cálculo individual de cada muestra se obtienen los parámetros estadísticos (media, mediana,...). De forma similar se

obtienen los estadísticos que resumen la ganancia porcentual relativa de CBN se calcula a partir de la creación de una variable, muestra a muestra, mediante la fórmula:

$$*Ganancia\ relativa\ CBN = (CBN\ 2^\circ\ análisis - CBN\ 1^\circ\ análisis) \times 100 / CBN\ 1^\circ\ análisis$$

A partir del cálculo individual de cada muestra se obtienen los parámetros estadísticos (media, mediana,...).

4. Condiciones ambientales del almacenamiento

Las condiciones ambientales registradas por medio de un Luxometro marca HAGNER MODELO EC1 y Termohigrometro IAQ CALC se llevaron a cabo con periodicidad trimestral desde 2017 a diciembre del 2020 y se presentan en la Tabla 1.

Resultados

1. Análisis del Cannabis durante 3 años a temperatura ambiente.

Se analizan 26 muestras de cannabis (planta 6ª), todas ellas eran cogollos de diferentes tamaños y una de hojas, y de las cuales 9 tenían CBN inicial, no hubo ninguna muestra que se detectara CBD durante el periodo 2018 a 2020. Los valores iniciales del THC de las muestras oscilan entre 34,59% a 4,13% y CBN entre 0 y 2,58% .

1.1 Estudio de la concentración y pérdida de THC en condiciones ambientales.

La Tabla 2 presenta los valores de concentración del THC en los diferentes momentos analíticos de las muestras ambientales.

La pérdida porcentual relativa de la concentración de THC se presenta en la Tabla 2 (parte inferior) presenta una media de pérdida de riqueza que oscila del 10% (comparación 1º y 2º análisis, a los 3 meses) hasta 53% (comparación 1º y 8º análisis, a los 36 meses). La pérdida de THC es estadísticamente significativa (p-valor=0,000). En las comparaciones dos a dos se observa que la concentración inicial comienza a ser estadísticamente significativa a partir del 3º análisis (p-valor = 0,002, tamaño del efecto = 0,94 y potencia estadística = 87%), continuando la significación con los siguientes análisis.

1.2 Estudio de la concentración de CBN

Los valores de la concentración de CBN están en la Tabla 3 (parte superior). Comprende los valores del CBN en los diferentes momentos analíticos de muestras ambientales.

La ganancia porcentual relativa de la concentración de CBN se presenta en la Tabla 3 (parte inferior) y la media de ganancia de pureza oscila de 45,49% (comparación 1º y 2º análisis, a los 3 meses) hasta 205,77% (comparación 1º y 8º análisis, a los 36 meses). La ganancia relativa de CBN es estadísticamente significativa (p-valor=0,000).

Tabla 1. Registros ambientales espacios (planta 6ª y semisótano) y frigorífico

	Tª Frigo.	Tª Semis.	Tª P. 6ª	Ppm PCO2 Semis.	Ppm PCO2 P. 6ª	Luz (*) Semis.	Luz(*) P. 6ª	H.R.(%) Frigo.	H.R.(%) Semis.	H.R.(%) P. 6ª
N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Validos										
Media	4,74	18,07	20,25	459,68	461,37	21,84	512,68	47,63	37,16	37,28
Mediana	5	18,30	19,30	461	458	18	545	48	37,60	37,30
Desviación Típica	0,45	4,32	4,96	53,32	44,43	12,97	77,80	2,50	2,50	2,43
Rango	1	13,70	13,90	181	197	40	271	9	9	8,80
Mínimo		11,30	13,70	389	363	10	379	32	32	32,10
Máximo		25	27,60	570	560	50	650	41	41	40,90

Fuente: elaboración propia

Tª: temperatura; Frigo: frigorífico; Semis: Semisótano; P.6ª: Planta sexta;

(\*) expresado en LUX; H.R.(%) : % Humedad Relativa

Salvo la temperatura en planta, el resto siguen curva Normal. Sólo hay diferencia estadísticamente significativa en luminosidad (lux) (p-valor=0,0001)

**Tabla 2.** Valores concentración y pérdida THC en diferentes momentos analíticos (6ª Pl.)

Valores THC(%)		THC_1	THC_2	THC_3	THC_4	THC_5	THC_6	THC_7	THC_8
		0	3 m	6 m	9 m	18 m	24 m	31m	36 m
N	Válidos	26	26	26	26	26	26	26	26
	Perdidos	0	0	0	0	0	0	0	0
Media		15,44	13,81	12,87	11,10	9,83	9,60	7,62	7,18
Mediana		15,46	14,17	13,84	12,57	11,20	10,50	8,53	7,17
Desviación Típica		5,85	5,02	5,05	4,40	4,08	4,18	3,19	3,08
Rango		30,46	24,85	24,09	18,65	14,54	14,54	10,84	10,84
R. Intercuartílico		6,30	5,55	7,04	6,63	8	7,64	5,46	1,06
Coef. Variación		37,9%	36,4%	39,2%	39,6%	41,5%	43,5%	41,9%	42,9%
<b>Pérdida Relativa THC (%)*</b>		0-3 m		0-6 m	0-9 m	0-18 m	0-24 m	0-31 m	0-36 m
Media		10,00		17,30	27,75	35,75	37,65	50,55	53
Mediana		7,13		12,83	27,65	36,78	39,67	48,91	53,71
Desviación Típica		8,68		11,55	15,23	17,14	16,95	12,68	13,03
Rango		34,72		43,50	59,62	65,72	65,72	51,24	44,52
R. Intercuartílico		7,68		12,75	21,75	22,04	2,22	13,93	19,24
Coef. Variación		86,8%		66,8%	54,9%	47,9%	45%	25,1%	24,6%

\*La pérdida porcentual relativa se obtiene comparando el valor inicial de THC con el obtenido en los diferentes momentos analíticos

Frigo: frigorífico; Semis: Semisótano; P.6ª: Planta sexta

**Tabla 3.** Concentración y Ganancia (%) de CBN en diferentes momentos analíticos (6ª Planta)

Concentración (%)	CBN_1	CBN_2	CBN_3	CBN_4	CBN_5	CBN_6	CBN_7	CBN_8
	0	3 m	6 m	9 m	18 m	24 m	31 m	36 m
Válidos	9	9	9	9	9	9	9	9
Péridos	17	17	17	17	17	17	17	17
Media	0,34	0,95	1,26	1,58	1,78	1,83	2,23	2,34
Mediana	0	0,83	1,12	1,44	1,60	1,69	2,00	2,29
Desviación Típica	0,56	0,47	0,58	0,67	0,77	0,80	0,96	0,90
Rango	2,25	2,17	2,59	2,83	3,38	3,38	4,28	4,28
R. Intercuartílico	0,69	0,30	0,38	0,57	0,72	0,60	0,85	1,06
Coef. Variación	164%	49,5%	46%	42,4%	43,3%	43,7%	43%	38,5%
<b>Ganancia Relativa (%)*</b>	0-3 m		0-6 m	0-9 m	0-18 m	0-24 m	0-31 m	0-36 m
Media	45,49		80,77	131,37	156,14	178,86	199,57	205,77
Mediana	16,90		42,62	66,20	87,95	87,95	124,30	128,89
Desviación Típica	50,19		109,56	137,95	159,08	166,64	192,22	154,23
Rango	138,61		321,08	433,01	496,17	496,17	579,59	476,36
R. Intercuartílico	38,94		31,58	72,96	175,69	104,26	109,69	162,66
Coef. Variación	110%		135%	105%	101,9%	93,2%	96,3%	75%

\* La ganancia porcentual relativa se obtiene comparando el valor inicial de THC con el obtenido en los diferentes momentos analíticos.

En las comparaciones dos a dos se observa que la concentración inicial comienza a ser estadísticamente significativa a partir del 3º análisis (p-valor = 0,000, tamaño del efecto = 1,47 y potencia estadística = 99,98%), continuando la significación con los siguientes análisis.

## 2. Análisis del Cannabis durante 4 años a temperatura ambiente versus frigorífico

Se analizan 26 muestras de cannabis, muestras tipo 2, depositadas en el semisótano del edificio y otras 26 muestras de cannabis de la misma procedencia depositadas en un frigorífico. Todas ellas eran cogollos de diferentes tamaños y una era hojas, y de las cuales 9 tenían CBN, no hubo ninguna muestra que se detectara CBD. Los valores iniciales del

THC oscilan entre 23,12% a 8,2% y el CBN entre 0 y 1,53%.

### 2.1. Estudio de la concentración THC

La Tabla 4 (parte superior) presenta los resultados analíticos de la concentración de THC en medios ambientales habituales. El valor de la concentración media de THC va descendiendo mientras que el coeficiente de variación aumenta ligeramente en los sucesivos análisis. Hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones medias de THC en los diferentes análisis de las muestras de cannabis conservadas a temperatura ambiente (p-valor = 0,000).

Las comparaciones dos a dos (muestras ambientales) ofrecen valores de significación estadística. La concentración media de THC en las muestras de cannabis conservadas a temperatura ambiente desciende conforme transcurre el tiempo. El descenso es significativo estadísticamente y con un elevado tamaño de efecto, salvo entre el 1º y 2º análisis que es un tamaño de efecto medio. La distribución de la concentración media de THC aumenta ligeramente su variabilidad con el paso del tiempo.

En las muestras conservadas en el frigorífico el valor de la concentración media de THC va descendiendo mientras que el coeficiente de variación está estable con los sucesivos análisis. El descenso es significativo estadísticamente y con un elevado tamaño de efecto respecto a la concentración ya desde el 2º análisis. Hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones medias de THC en los diferentes análisis de las muestras (p-valor = 0,000). Las comparaciones dos a dos, ofrecen valores de estadísticamente significativos.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los descensos que experimentan las concentraciones medias de THC de las muestras de cannabis, en el mismo momento temporal, comparando situación ambiental con conservación en frigorífico. La concentración media de THC desciende más significativamente y con elevado tamaño de efecto en las muestras conservadas a temperatura ambiente.

La pérdida porcentual relativa final de la riqueza de THC (Tabla 4 parte inferior) del cannabis en medios ambientales habituales (semisótano) es de 59,37% en relación a la concentración inicial y en frigorífico del

30,94%.

No existe una correlación significativa entre la concentración inicial de THC de cannabis y la pérdida porcentual relativa que experimenta en los siguientes análisis. La pérdida de THC en cannabis no está relacionada con la concentración inicial del mismo principio activo.

Los coeficientes de variación de esta pérdida porcentual relativa de THC expresan una diversidad en la pérdida relativa que experimenta cada muestra de cannabis. Esta disparidad es menor al avanzar el tiempo y menor la que experimenta las muestras conservadas a temperatura ambiente. Las muestras de cannabis conservadas a temperatura ambiente experimentan una pérdida porcentual relativa de su concentración de THC menos variable que las conservadas en frigorífico.

La comparación entre muestras ambientales y muestras en frigorífico de cannabis referente a la pérdida porcentual relativa de THC, ofrece diferencias estadísticamente significativas tanto en el 2º como en el 3º y en el 4º análisis.

Las muestras de cannabis a temperatura ambiente experimentan una pérdida relativa de su concentración de THC, significativamente y con tamaño del efecto elevado, mayor que las muestras en frigorífico.

La Tabla 5 recoge la comparación de la pérdida porcentual relativa de THC entre muestras distintas pero de concentraciones iniciales similares en dos ambientes ambientales diferentes, planta sexta y planta semisótano.

**Tabla 4.** Concentración y Pérdida porcentual relativa de THC. Cannabis-Ambiente (Semisótano) y frigorífico.

Estadísticos	THC_1º análisis	THC_2º análisis	THC_2º análisis	THC_3º análisis	THC_3º análisis	THC_4º análisis	THC_4º análisis
	0	18 m	18 m	36 m	36 m	48 m	48 m
N Válidos	26	26	26	26	26	26	26
Media	13,94	10,04	12,98	7,61	11,78	5,62	9,60
Mediana	14,30	10,09	13,68	6,79	12,68	5,30	10,08
Desviación Típica	3,88	2,80	3,67	2,50	3,39	2,10	2,80
Rango	14,92	10,16	14,02	8,42	13,13	5,87	11,84
R. Intercuartílico	5,26	4,43	5,34	4,20	4,87	4,33	11,84
Coef. Variación	27,8%	27,9%	28,3%	32,9%	28,8%	37,4%	29,2%
	<b>Inicial</b>	<b>Semis.</b>	<b>Frigo.</b>	<b>Semis.</b>	<b>Frigo.</b>	<b>Semis.</b>	<b>Frigo.</b>
<b>Pérdida porcentual relativa THC</b>							
*	0-18 m		0-18 m	0-36 m	0-36 m	0-48 m	0-48 m
Media	27,73		6,88	45,06	15,59	59,37	30,94
Mediana	28,29		4,73	43,58	12,90	60,11	31,89
Desv. Desviación	9,87		6,06	11,33	8,95	11,42	9,68
Rango	51,14		28,29	43,10	38,85	49,05	42,71
R. Intercuartílico	10,97		5,68	16,61	12,91	15,33	14,03
Coef. Variación	35,6%		87,9%	25,1%	57,4%	19,2%	31,3%
	<b>Semis.</b>		<b>Frigo.</b>	<b>Semis.</b>	<b>Frigo.</b>	<b>Semis.</b>	<b>Frigo.</b>

\*La pérdida porcentual relativa se obtiene comparando el valor inicial de THC con el obtenido en los diferentes momentos analíticos (18,36 y 48 meses) en muestras depositadas en el semisótano y en el frigorífico

**Tabla 5.** Comparación Pérdida porcentual relativa THC. Cannabis -Ambiente

Estadísticos	Pérdida % THC entre 1ºy2º análisis	Pérdida % THC entre 1ºy2º análisis	Pérdida % THC entre 1ºy3º análisis	Pérdida % THC entre 1ºy3º análisis	Pérdida % THC entre 1ºy4º análisis
	0-18 m	0-18 m	0-36 m	0-36 m	0-48 m
N Válidos	26	26	26	26	26
Media	27,73	35,75	45,06	53	59,37
Mediana	28,29	36,78	43,58	53,71	60,11
Desviación Típica	9,87	17,14	11,33	13,03	11,42
Rango	51,14	65,72	43,10	44,52	49,05
R. Intercuartílico	10,97	22,04	16,61	19,24	15,33
Coef. Variación	35,6%	47,9%	25,1%	24,6%	19,2%
	<b>SEMISOTANO</b>	<b>6ª PLANTA</b>	<b>SEMISOTANO</b>	<b>6ª PLANTA</b>	<b>SEMISOTANO</b>

## Discusión

La potencia de THC de las muestras de cannabis utilizadas en este trabajo es muy diferente, más alta, que la de los estudios más antiguos referentes a la degradación (Lerner 1969; Liskow 1970; Coffman y Gentner 1974; Turner y ElSohly 1979, Harvey 1990; Ross y ElSohly 1997), como también el tiempo de estudio de almacenamiento superior a los dos años (Turner et al 1973 y Fairbain et al 1976), y una metodología ajustada a la realidad del trabajo cotidiano poco relacionado con trabajos con metodologías de investigación básica y número reducido de muestras (Coffman y Gentner, 1974; Harvey 1990) por lo que los resultados de degradación van a diferir en estos casos.

A continuación examinamos los resultados en los escenarios planteados en el trabajo:

### 1. Degradación cannabis/marihuana durante 3 años a temperatura ambiente

Las 26 muestras de cannabis almacenadas y sometidas a una condiciones ambientales habituales asociadas a las estaciones del año tuvieron una progresiva pérdida porcentual de la concentración del THC, estadísticamente significativa, con unas medias de 10% en los tres primeros meses hasta el 53% a los tres años, y fue más acentuada en el primer año (pérdida 27,75% a los 9 meses) y siendo mayor el decrecimiento a medida que aumentaba el tiempo de depósito aunque con enlentecimiento de la descomposición con un porcentaje menor de degradación anual. Este resultado, 10%, obtenido a los tres meses es similar al encontrado por Lerner 1969 que informó que la marihuana se deterioraba durante el almacenamiento a temperatura ambiente a una tasa de 3 a 5 por ciento al mes de pérdida de THC; Zamengo et al. 2019 señalan resultados similares, el promedio de THC de degradación en los primeros 100 días fue de aproximadamente de 13% (luz 24 horas y temperatura ambiente 22°C) y 11% (oscuridad 24 horas y temperatura ambiente 22°C) si bien no son idénticas condiciones. Trofin et al 2011 presentan datos que reflejan un proceso de degradación más intenso (pérdida 83,4% de THC a los tres años) quizá motivado por la forma de secado de la planta (horno a 25°C durante 96 horas), no natural, condiciones de almacenamiento 24 horas luz y a 22°C y 24 horas oscuridad y 4°C, y la variabilidad de las plantas estudiadas.

Respecto al CBN se incrementó su valor teniendo una media de ganancia relativa en los tres primeros meses de 45,49% hasta 205,77% a los tres años, la mayoría del aumento del periodo se llevó a cabo en el primer año (aumentó la ganancia un 131,37% a los nueve meses respecto a la concentración inicial). Los resultados obtenidos tienen una ganancia relativa menor a los señalados por Trofin et al 2011 que también resalta un aumento de CBN mayor en el primer año que en los siguientes.

El proceso de degradación, bien pérdida de la concentración de THC o ganancia de CBN, está influido por la luz y el efecto de la temperatura como ya había sido expuesto por otros autores previamente mencionados.

### 2. Análisis de degradación cannabis/marihuana durante 4 años en condiciones ambientales versus frigorífico.

Se analizan 26 muestras depositadas en el semisótano y muestras de idéntica procedencia conservadas en frigorífico.

La concentración media de THC en las muestras de marihuana conservadas a temperatura ambiente y en frigorífico desciende conforme transcurre el tiempo. El descenso es significativo estadísticamente en ambos espacios y variabilidad similar.

La pérdida porcentual relativa de THC es superior en zona semisótano a la del frigorífico. La pérdida porcentual relativa de THC alcanzó el 59,37% al final de los cuatro años en la zona del semisótano y en las muestras en frigorífico fue de 30,94% en el mismo periodo, si bien hay diferencias notables de temperatura y luz en ambos espacios. La mayor

variabilidad del coeficiente de variación en las muestras frigorífico respecto a las ambientales se podría justificar debido a un mayor porcentaje de humedad relativa de las condiciones de las primeras.

Las muestras depositadas en el frigorífico pese a sus condiciones de conservación siguen teniendo activo el proceso de degradación del THC aunque enlentecido, conforme investigaron Lewis y Turner 1979 que proponían una vía de descomposición de THC a CBN que implicaba a productos intermedios. Fairbain et al. 1976 informaron que la luz es el factor individual más importante en la degradación del THC.

Trofin et al 2011 obtuvieron resultados de degradación más altos (pérdida de riqueza de THC del 85,31% al final de cuatro años de conservación de plantas de cannabis en condiciones de oscuridad y a 4°C) que nuestras muestras en condiciones ambientales y en frigorífico. La justificación pudiera ser que el cannabis utilizado en nuestro estudio es una miscelánea de plantas con diferente desarrollo.

Zamengo et al 2019 indican que la luz tiene un efecto significativo sobre la degradación del THC y que produce que los materiales de cannabis almacenados en ambientes oscuros experimentan una degradación más lenta y también se ha observado que la luz aumenta la velocidad de descomposición del THC pero no la de la formación de CBN, mientras que la temperatura afectó a todas las condiciones de almacenamiento, si bien las condiciones de tipo C (oscuridad y refrigeración 4°C) y tipo D (oscuridad y congelación -20°C) fueron significativamente menores que los obtenidos para las condiciones tipo A y B, salas de temperatura 22°C (con luz 24 h ó a oscuras) es razonable suponer que la luz y la temperatura median diferentes mecanismos de degradación del THC.

En la comparación de muestras distintas en condiciones ambientales, aunque con concentraciones iniciales semejantes se observa una disminución progresiva de la pérdida porcentual de THC más intensa de las muestras que soportan mayor luminosidad diaria (6ª planta) con similar temperatura y humedad relativa. La explicación podría ser debido a la diferencia de luz en ambos depósitos (21,84 lux y 512,68 lux de media).

## Conclusiones

El estudio ratifica la influencia de la luz y la temperatura en el proceso de degradación del cannabis pero el tiempo de permanencia de almacenamiento estimula la descomposición del THC. Por ello el modelo de depósito de las drogas incautadas debe ser un área poca o nula luminosidad y temperatura baja, a ser posible frigorífico en aquellas situaciones que se prevean conflictivas.

## Bibliografía

1. Fairbairn, J.W., Liebmann J.A., Rowan, M.G. "The stability of cannabis and its preparations on storage", *J. Pharm. Pharmac.*, vol. 28 (1976), págs. 1-7.
2. Hartsel J.A., Eades J., Hickory B., Makriyannis A. *Chapter 53 Cannabis sativa and Hemp*. 2016, Pages 735-754. In *Nutraceuticals. Efficacy, Safety and Toxicity*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>
3. Harvey D.J., "Stability of cannabinoids in dried samples of cannabis dating from around 1896-1905", *J. Ethnopharmacol.* 28 (1990) 117-128. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90068-5)
4. Lerner, P. *Precise determination of tetrahydrocannabinol in marihuana and hashish*, *Bull. 1969. Narc.* Issue 21 (1969), N°3, 39-42.
5. Lewis G.S., Turner C.E. "Constituents of Cannabis sativa L. XIII: Stability of Dosage Form Prepared by Impregnating Synthetic (-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol on Placebo Cannabis Plant Material". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1978) Volume 67, Issue 6, 876 - 878.
6. Ross S.A., ElSohly M.A., "CBN and delta-9-tetrahydrocannabinol ratio as an indicator of the age of stored marijuana samples", *Bull.*

Narc. 49 (1997) 139–147.

7. Trofin I.G. et al. "Influence of Storage Conditions on the Chemical Potency of Herbal Cannabis", *J. of Chimie* 62(6) (2011) , pp. 639–645.
8. Turner C.E. et al. "Constituents of Cannabis sativa L. IV: Stability of Cannabinoids in Stored Plant Material", *J. Pharm. Sci.*, vol. 62, No. 10 (1973), págs. 1601-1605. <https://doi.org/10.1002/jps.2600621005>
9. UNODC 2010 . Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos. Viena. *Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis. Manual para uso de los laboratorios nacionales de estupefacientes.ST/NAR/40*. Naciones Unidas. Nueva York, 2010. Disponible en: [https://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis\\_manual-Sp.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis_manual-Sp.pdf)
10. Turner, C.E. and Elsohly, M.A. (1979) "Constituents of Cannabis sativa L .XVI. A Possible Decomposition Pathway of Delta-9-Tetrahydrocannabinol to Cannabinol". *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 16 (1979), 1667-1668. <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.5570160834>
11. Zamengo L., et al. "The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: A four-year study" *.Forensic Sci Int.* 2019 May;298:131-137. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.058>

## ACTAS DE LAS JORNADAS DE TOXICOLOGÍA ESPAÑOLAS E IBEROAMERICANAS, 2023

**Comité Científico:** María José Ruiz Leal, Rafael Balaña Fouce, Ana María Bermejo Barrera, Mónica Fernández Franzón, Fernando Gil Hernández, Ana Isabel Morales Martín, Rosario Moyano Salvago, Silvia Pichardo Sánchez, Juan Carlos Ríos, Francisco Soler Rodríguez.

**Comité Organizador:** Ana María Bermejo Barrera, María Jesús Tabernero Duque, Ana María Cameán Fernández, María José Ruiz Leal, Nahum Ayala Soldado, Emma Martínez López, Ángeles Mencía Jos Gallego, Iván Álvarez Freire, Pamela Cabarcos Fernández.

*Organizadas por la Asociación Española de Toxicología (AETOX) en colaboración con la Universidad de Santiago de Compostela el 29 de junio de 2023.*

**Lugar de celebración:** Hospedería San Martín Pinario, Santiago de Compostela.

Colocación de carteles en el Salón Peregrinos, zona lateral.

### COMUNICACIONES ORALES DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y EDUCACIÓN EN TOXICOLOGÍA

**Moderadoras:** Dras. Mónica Fernández Franzón y Silvia Pichardo Sánchez

#### SA-01) POTENCIAL MUTAGENICIDAD Y GENOTOXICIDAD PRODUCIDA POR LA MEZCLA DE DOS CIANOTOXINAS COMUNES: ANATOXINA-A Y CILINDROSPERMOPSINA

Plata-Calzado C, Prieto AI, Díez-Quijada L, Medrano-Padial C, Jos A, Cameán AM.

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

La presencia simultánea de toxinas en las floraciones de cianobacterias constituye un escenario habitual en la naturaleza, que podría dar lugar a efectos tóxicos diferentes a los observados tras la exposición a cianotoxinas individuales. La vía oral, mediante el consumo de aguas y alimentos contaminados, es una de las principales vías de exposición en el hombre. En el presente trabajo se evalúa el potencial mutagénico y genotóxico de la mezcla de dos cianotoxinas, anatoxina-a (ATX-a) y cilindropermopsina (CYN), mediante una batería de ensayos *in vitro*: ensayo de Ames (OECD 471) y test de micronúcleos (MN) (OECD 487) recomendados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, para evaluar el perfil genotóxico de sustancias presentes en alimentos. En ambos ensayos las concentraciones utilizadas de ATX-a:CYN tuvieron una proporción 1:1 similar a la encontrada en la naturaleza. Para el ensayo de Ames se emplearon 5 cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537) y un rango de concentraciones de 0,125 a 2 µg/mL de la mezcla en ausencia y en presencia de la fracción metabólica S9 durante 72 h. El test de MN se realizó en células L5178YTk± en ausencia (0,052-1,35 µg/mL ATX-a/CYN) y en presencia (0,125-2 µg/mL ATX-a/CYN) de S9 durante 4 h y 24 h. Los resultados no mostraron efecto mutagénico. No obstante, en el ensayo de MN, se observó un incremento significativo del porcentaje de células binucleadas con micronúcleo respecto al control negativo con y sin S9. Estos son los primeros resultados que muestran genotoxicidad *in vitro* de la mezcla ATX-a/CYN, poniendo de manifiesto la necesidad de realizar ensayos de toxicidad de mezclas para una evaluación del riesgo más realista.

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-104890RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) Cristina Plata-Calzado y Leticia Díez-Quijada agradecen a la Junta de Andalucía (contrato PREDOC\_00447 y POSTDOC\_21\_00130, respectivamente) sus contratos pre y post-doctoral, respectivamente.

**Palabras clave:** Anatoxina-a, Cilindropermopsina, genotoxicidad, mutagenicidad

#### SA-02) EFECTO DE TECNOLOGÍAS INNOVADORAS DE

#### PROCESADO DE ALIMENTOS EN LA MITIGACIÓN DE MICOTOXINAS EN BEBIDAS A BASE DE FRUTA

Pallarés, N., Sebastià, A., Castagnini, J.M.; Ferrer, E., Barba, F-J., Berrada, H.

*Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia, e-mail: houda.berrada@uv.es*

Actualmente los consumidores exigen alimentos con excelentes propiedades nutricionales y sensoriales y que respondan a todos los estándares de seguridad alimentaria. En este sentido, la industria alimentaria apuesta por tecnologías de procesamiento de alimentos que ayuden a mitigar contaminantes fortuitos como las micotoxinas de alimentos de consumo diario como los cereales, frutas secas, especias, café, frutas y sus derivados con el menor deterioro posible de sus propiedades nutricionales. Se explora en este trabajo la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF) y altas presiones hidrostáticas (HPP) como una alternativa de procesamiento de alimentos sostenible para la reducción de aflatoxinas y eniatinas en bebidas a base de fruta. PEF permite la aplicación de tratamientos eléctricos de diferente intensidad de campo eléctrico durante cortos periodos de tiempo a una matriz alimentaria que se coloca entre dos electrodos en lotes estáticos, o bajo flujo continuo con repetición de pulsos adaptados al caudal del alimento para fomentar la formación de poros y aumentar la permeabilidad de las membranas biológicas. Por otro lado, el equipo de HPP permite generar una alta presión que se transmite de manera uniforme e instantánea a través de la matriz alimentaria. Después del tratamiento, las micotoxinas se extraen mediante microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y se determinan mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS-IT) con un método optimizado previamente en nuestro laboratorio. Se valora el impacto de las dos técnicas a través de los porcentajes de reducciones de las micotoxinas estudiadas que alcanzaron rangos variables hasta un 80 % en diferentes modelos de zumo tras tratamiento HPP con 600 MPa durante 5 min y PEF de 30 kV. Asimismo, las reducciones obtenidas con PEF y HPP superan en muchos casos las obtenidas con un tratamiento térmico convencional a 90 °C durante 21 s. Las técnicas HPP y PEF se presentan como una herramienta eficaz para incorporar a la industria alimentaria para disminuir los contenidos de micotoxinas con un impacto mínimo en los atributos de calidad.

**Palabras clave:** Mitigación, micotoxinas, PEF, HPP

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2020-115871RB) y por el proyecto AICO/2021/037 de la Generalitat Valenciana.

#### ED-01) APRENDIZAJE ACTIVO MEDIANTE LA ELABORACIÓN DE VIDEOS POR LOS ESTUDIANTES DE SEGURIDAD ALIMENTARIA DEL GRADO EN CIENCIAS GASTRONÓMICAS DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Fernández-Franzón, M., Tolosa, J., Ferrer, E., Juan-García, A., Ruiz MJ, Berrada, H.

*Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia, e-mail: monica.fernandez@uv.es*

La elaboración de videos por los estudiantes favorece la adquisición de habilidades y conocimientos de una forma más dinámica y práctica, permitiéndoles explorar algunos temas de manera más creativa y desarrollar habilidades comunicativas. Por otro lado, la utilización de actividades grupales ayuda a generar competencias sociales y mejorar el clima de aprendizaje. La asignatura de Seguridad Alimentaria del Grado de Ciencias Gastronómicas es una asignatura semestral de segundo curso con una carga lectiva de 4,5 créditos en la que se imparten temas sobre toxicología básica, sustancias tóxicas presentes en los alimentos, prevención de las intoxicaciones alimentarias, higiene alimentaria y evaluación de riesgos. Durante el curso 2022-23 se les planteó a los estudiantes una actividad docente evaluable en la que elaboraban un video de corta duración relacionado con la seguridad

alimentaria. Los temas elegidos podían ser sobre las noticias publicadas en la página web de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) o los Informes realizados por el Comité Científico de la AESAN. Se crearon grupos de cuatro o cinco estudiantes, y tras la elección del tema, los estudiantes elaboraron un guion del contenido del video que fue supervisado por las profesoras antes de su elaboración. También, se proporcionó a los estudiantes instrucciones básicas sobre la realización de los videos, así como una lista de software y programas gratuitos para grabar y editar los vídeos. En total se presentaron 9 vídeos. Para favorecer el aprendizaje durante el visionado de los videos en el aula, cada grupo elaboró preguntas relacionadas con el tema utilizando diferentes aplicaciones (kahoot, mentimeter o socrative) y así incentivar que se estableciera un debate activo. Tanto los estudiantes como las profesoras evaluaron positivamente las actividades planteadas ya que se integran diferentes metodologías de aprendizaje y se fomenta el aprendizaje activo y participativo del estudiantado.

**Agradecimientos:** Proyecto de Innovación Docente RENOVA-PID “UV-SFPIE\_PID-2079652”.

**Palabras clave:** vídeos, Seguridad Alimentaria, AESAN, metodologías activas

### ED-O2) PÍLDORAS EDUCATIVAS COMO HERRAMIENTA DE APRENDIZAJE EN LOS SEMINARIOS DE TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA DEL GRADO DE NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Ferrer, E., Berrada, H., Juan-García, A., Ruiz MJ, Fernández-Franzón, M, Tolosa, J.

*Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia, e-mail: M.Jose.Ruiz@uv.es*

Las Píldoras Educativas (PE) constituyen una importante herramienta pedagógica que puede complementar la estrategia tradicional de formación y optimizar la transferencia de conocimiento a través de una mayor motivación y participación de los estudiantes. Las PE son la unidad más pequeña de información con significado propio que inciden sobre conocimientos, actitudes o procesos de interés para una materia. Consisten en vídeos de corta duración que siguen la teoría del aprendizaje social según la cual los alumnos aprenden con otros alumnos mientras utilizan herramientas multimedia. Debido a estas ventajas, a lo largo del presente curso se ha aplicado dicha metodología a los seminarios coordinados de la asignatura de Toxicología Alimentaria del grado en Nutrición Humana y Dietética de la Universitat de València. En los seminarios, los estudiantes deben trabajar en equipo para elaborar una memoria sobre un tema relacionado con la asignatura y su posterior exposición al resto de compañeros. En el presente proyecto se ha incentivado a los alumnos a preparar los seminarios en formato de vídeo, en lugar de la “tradicional” presentación con diapositivas. El tema ha sido elegido por los estudiantes bajo la supervisión del profesorado. Previamente, el profesorado facilitó a los alumnos información sobre programas y softwares gratuitos para la grabación y edición de los vídeos, así como pautas y recomendaciones para la elaboración de las PE. Las PE elaboradas por los alumnos han sido visualizadas en las sesiones de seminarios de la asignatura, tras la cual los alumnos respondieron a preguntas de compañeros y profesores. Finalmente, las PE son evaluadas a través de las rúbricas elaboradas para dicha finalidad. De esta manera se ofrece a los alumnos una estrategia alternativa aplicable al trabajo en aula, la cual ha mostrado una buena aceptación por parte de los alumnos, aumentando la motivación y el autoaprendizaje a nivel individual y de grupo.

**Palabras clave:** píldoras educativas, vídeos, estrategias docentes, motivación, coordinación

**Agradecimientos:** Proyecto de Innovación Docente RENOVA-PID “UV-SFPIE\_PID-2079652”.

## COMUNICACIONES ORALES DE TOXICOLOGÍA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS ALTERNATIVOS

**Moderadores:** Drs. Nahúm Ayala Soldado y Rafael Balaña Fouce

### EX-O1) (THIO)XANTHONES-MEDIATED P-GLYCOPROTEIN ACTIVATION: AN IN SILICO STUDY

J. Veiga-Matos<sup>1,2,\*</sup>, D. J. V. A. dos Santos<sup>3</sup>, E. Sousa<sup>4,5</sup>, M. Prieto<sup>2</sup>, F. Remião<sup>1</sup>, R. Silva<sup>1</sup>

*1 UCIBIO/REQUIMTE, Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313, Porto, Portugal 2 Unidad de Toxicología, Universidad de Salamanca, España; Group of Translational Research on Renal and Cardiovascular Diseases; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL); Campus Miguel de Unamuno, Edificio Departamental, 37007, Salamanca, España 3 CBIOS— Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal. 4 Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313, Porto, Portugal 5 CIIMAR – Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões, Matosinhos, Portugal \* E-mail: jessicamatos1996@outlook.com*

**Background:** P-glycoprotein (P-gp) is an efflux transporter located at the apical membrane of important barrier tissues, playing a crucial role in the detoxification of endobiotics and xenobiotics [1]. (Thio)xanthonic derivatives have been shown to be able of activating P-gp without increasing its expression, promoting an immediate increase in the amount of transported substrate. Thus, P-gp activation limits the intracellular accumulation of harmful P-gp substrates and, consequently, reduces their toxicity [2,3][2,3]. **Objective:** The aim of this study was to elucidate, in silico, by molecular docking analysis, the P-gp binding sites of different (thio)xanthonic derivatives previously reported as P-gp activators, and to correlate the in silico predictions with in vitro data reported in the literature. **Methods:** Molecular Operating Environment (MOE) software was used to build all the 3D-structures (with minimized energy) and Autodock Vina was used to perform the molecular docking analysis, to obtain the affinity energy between the human P-gp model [at the drug-binding pocket (DBP) and nucleotide binding domains (NBDs) 1 and 2] and P-gp activators. The best pose was visualized and the number and type of interactions of the evaluated compounds with specific P-gp residues was verified by using the BINANA software. **Results:** The molecular docking analysis revealed that most of P-gp activators preferentially bind to DBP or NBD1. Relatively to DBP, almost all P-gp activators bind to residues located in the modulators (M)-site. Furthermore, the evaluation of interactions between P-gp activators and P-gp residues indicated a pattern, since several P-gp activators shared the same hydrophobic contacts and other interactions (hydrogen-bonds and pi-pi, t-stacking and cation-pi interactions) with specific P-gp residues. **Conclusions:** The present study confirmed that (thio)xanthonic derivatives are capable of binding to P-gp, specifically at the M-site of the DBP and at the NBD1 and, therefore, these binding interactions may potentially be involved in (thio)xanthonic derivatives-mediated P-gp activation.

**Keywords:** computational studies; xanthones; molecular docking; MOE software; BINANA software

**Acknowledgements:** Funding: This research was funded by FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), UIDB/04423/2020, UIDP/04423/2020, grant number 2021.06177.BD, through national funds.

#### References:

[1] J. Veiga-Matos, F. Remião, A.I. Morales, Pharmacokinetics and Toxicokinetics Roles of Membrane Transporters at Kidney Level, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 23 (2020) 333–356. <https://doi.org/10.18433/jpps30865>.

[2] R. Silva, A. Palmeira, H. Carmo, D.J. Barbosa, M. Gameiro, A. Gomes, A.M. Paiva, E. Sousa, M. Pinto, M. de L. Bastos, F. Remião, P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized

thioxanones prevents paraquat cytotoxicity, Arch. Toxicol. 89 (2015) 1783–1800. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1333-4>.

[3] E. Martins, V. Silva, A. Lemos, A. Palmeira, P. Puthongking, E. Sousa, C. Rocha-Pereira, C.I. Ghanem, H. Carmo, F. Remião, R. Silva, Newly synthesized oxygenated xanones as potential P-glycoprotein activators: In vitro, ex vivo, and in silico studies, Molecules. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24040707>.

### **EX-O2) DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA “IN VITRO” PARA EL CRIBADO DE COMPUESTOS CON ORGANOIDES INTESTINALES DE RATÓN.**

Galli, G.1, Melcón-Fernández, E.1, García-Estrada, C.1, Pérez-Pertejo, Y.1, Martínez Valladares, M.2, Balaña Fouce, R.1  
IDpt. CC. Biomédicas, Universidad de León y 2Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC), León \*Investigador Principal: Rafael Balaña Fouce; email: rbalf@unileon.es

En la investigación farmacéutica, la evaluación de la toxicidad de los candidatos a fármacos es un proceso crítico y complejo que requiere de métodos eficientes y confiables. Los modelos tradicionales de ensayo basados en animales y células cultivadas en monocapa presentan limitaciones significativas en términos de relevancia fisiológica y predicibilidad. En este contexto, el uso de organoides intestinales en la evaluación de toxicidad contribuye a la identificación temprana de compuestos prometedores y a la reducción del uso de animales en experimentación. Los organoides intestinales ofrecen ventajas significativas en la evaluación de la toxicidad. Su capacidad para mantener las características fisiológicas del intestino, como la presencia de diferentes tipos celulares y la formación de estructuras similares a las vellosidades intestinales, los convierte en un modelo más representativo de la respuesta del tejido comparado a cultivos 2D. Urge por lo tanto una alternativa para la evaluación de la tolerancia oral de nuevos tratamientos farmacológicos que sean seguros en el sitio de absorción sin la necesidad de utilizar animales de experimentación. Hemos desarrollado una plataforma de cribado con organoides intestinales de ratón en placas de 384 pocillos, para cribar la seguridad de compuestos químicos en condiciones HTS, utilizando la viabilidad celular con Azul Alamar como “endpoint”. Como prueba de concepto hemos utilizado varias colecciones de compuestos con potencial antiparasitario para determinar su tolerabilidad en organoides intestinales murinos para su posible administración oral. En la presente comunicación presentamos la puesta a punto de la plataforma y la validación de la misma sobre una colección de moléculas pequeñas y de combinaciones de fármacos y se discute el gran potencial de esta plataforma como futuro método alternativo de remplazamiento en Toxicología.

**Palabras clave:** Citotoxicidad, HTS, combinaciones terapéuticas, AlamarBlue, compuestos terapéuticos. MICINN PID2020-119035RB-100

### **MA-O1) EFECTOS DEL ÓXIDO DE GRAFENO REDUCIDO FUNCIONALIZADO CON DODECILAMINA EN DOS MODELOS CELULARES REPRESENTATIVOS DEL SISTEMA INMUNE**

Óscar Cebadero-Domínguez<sup>1</sup>, María Puerto<sup>1\*</sup>, Ana Cameán<sup>1</sup>, Ángeles Jos<sup>1</sup>. (mariapuerto@us.es)  
<sup>1</sup> Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Sevilla, España

El sistema inmune tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis. Por otro lado, el incremento del uso de materiales derivados del grafeno, como el óxido de grafeno reducido funcionalizado con dodecilamina (OGr-DA), requiere una evaluación toxicológica antes de su posible aplicación en diferentes áreas, como el envasado alimentario. Por este motivo, se ha realizado una evaluación toxicológica del OGr-DA mediante una batería de ensayos in vitro en las líneas celulares representativas del sistema inmune, Jurkat (linfocitos) y THP-1 (monocitos). Para ello, se midió la viabilidad celular a concentraciones entre 0-200 µg ml<sup>-1</sup>, durante 24 y 48 h. Además, se determinó la expresión de diferentes interleuquinas y

marcadores de apoptosis/necrosis después de 4 y 24 h de exposición mediante PCR. Por último, se evaluó el posible efecto sobre la diferenciación de monocitos a macrófagos después de la coexposición a forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y OGr-DA en células THP-1. Los efectos citotóxicos mostraron diferencias significativas a la concentración más alta ensayada en ambas líneas celulares. En general, la respuesta sobre la expresión génica de interleuquinas fue muy similar tanto en Jurkat como en THP-1, no observándose diferencias significativas en la mayoría de ellas. Sin embargo, sí se observó una mayor expresión de los genes de apoptosis/necrosis en la línea celular THP-1. Respecto a los posibles efectos del OGr-DA sobre la diferenciación de monocitos a macrófagos, no se observaron diferencias significativas respecto al control tratado con PMA. Es necesario continuar evaluando la posible toxicidad de este compuesto antes de su posible aplicación como material en contacto con alimentos.

**Agradecimientos:** Proyecto P18-RT-1993 (PAIDI-2020/FEDER, Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía). Ayuda del VII Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla para el uso de los Servicios Generales de Investigación (I.3) y del VI PPIT para la asignación temporal de espacios (I.8).

**Palabras clave:** Inmunotoxicidad, Da-rGO, Jurkat, THP-1

## **COMUNICACIONES ORALES DE DE TOXICOLOGÍA FORENSE Y CLÍNICA**

**Moderadoras:** Dras. Ana Bermejo Barrera y Ana Isabel Morales Martín.

### **TF-O1) “EL PAPEL DE LOS XENOBIÓTICOS EN EL MECANISMO DE SUICIDIO. LIMITACIONES”**

Begoña Bravo Serano. E-mail: begona.bravo@justicia.es

El número de fallecimientos por suicidio en España va aumentando año tras año, batiendo récords y convirtiéndose en la primera causa de muerte externa. Según los datos recogidos por el INE desde el año 2019 (3.671) hasta el año 2021 (4.003) el incremento ha sido de un 8,3% y según el avance proporcionado por este Organismo sobre el primer semestre del 2022 la tendencia en el incremento se mantiene.

Los mecanismos empleados son diversos, siendo los más frecuentes en orden decreciente, asfixia, intoxicación y precipitación. En estas muertes por suicidio con una gran frecuencia se encuentran implicados tóxicos, por ello es de gran interés ver la influencia de los tóxicos sobre el mecanismo de suicidio empleado y su relación con la edad, ya que otro dato dramático, es el aumento observado de muertes por suicidio en menores de edad.

Se hará una exposición de los resultados obtenidos en la investigación toxicológica sobre los 5.598 casos que se han recibido en el Instituto Nacional de Toxicológica y Ciencias Forenses durante el último trienio (2019-2021) con especial interés en las víctimas menores de 18 años y en la influencia de los tóxicos sobre el mecanismo de suicidio.

No en todos aquellos casos en los que se ha empleado un tóxico para provocar el fallecimiento es posible su detección en el laboratorio debido a varias causas por lo que se expondrán algunas limitaciones con casos reales.

### **TF-O2) DETERMINACIÓN DE DULOXETINA EN PLASMA POR MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA Y CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Mateo García Bouzamayor, Iván Álvarez Freire, María Del Carmen Barciela Alonso, María Jesús Tabernero Duque, Pamela Cabarcos Fernández, Ana María Bermejo Barrera.

*Servicio de Toxicología Forense. Instituto de Ciencias Forenses “Luis Concheiro” USC*

La duloxetina es un medicamento antidepresivo que pertenece a la clase de los inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN). Se utiliza principalmente para tratar la depresión, el trastorno de ansiedad generalizada, el dolor neuropático crónico y la fibromialgia.

Este fármaco puede ser tóxico si se ingiere en grandes cantidades o en combinación con otros medicamentos o sustancias que afecten al sistema nervioso central. En este trabajo se llevó a cabo la validación de un método para la determinación y la cuantificación de duloxetina en plasma sanguíneo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El procedimiento de extracción utilizado fue la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y los reactivos empleados fueron acetonitrilo como dispersante y diclorometano como extractante. Para la determinación del analito el método seleccionado fue la CG-EM, en el que se empleó codeína-D3 como patrón interno. La validación de la metodología propuesta se llevó a cabo siguiendo las directrices marcadas por la Food and Drug Administration (FDA) y los resultados obtenidos demostraron linealidad para el analito en el rango de concentración de 0,1 a 0,3 µg/mL. El límite de detección (LOD) determinado fue de 0,045 µg/mL y el límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue fijado en 0,1 µg/mL para el compuesto. Respecto al rendimiento de la extracción, se obtuvieron valores satisfactorios en todos los ensayos realizados.

**Palabras clave:** Duloxetina, CG-EM, plasma, DLLME

### CL-O1) CARACTERIZACIÓN DE LAS EXPOSICIONES A PRODUCTOS FARMACÉUTICOS EN UN CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICO CHILENO (CITUC).

Fernández C.1, Silva L.1, Medel P.1,2, Bettini M.1, Rebolledo D.1, Solari S.1,2,3, Ríos JC.1,2,3

1Centro de Información Toxicológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC); 2Programa de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile; 3Departamento de Laboratorios Clínicos, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile;

**Introducción:** Las intoxicaciones con medicamentos son aquellas que generan la mayor incidencia de intoxicaciones a nivel global. Según la “American Association of Poison Control Centers”, durante el 2021 un 50,3% de las exposiciones humanas estaban asociadas a un producto farmacéutico. **Objetivo:** Caracterizar los casos de exposiciones humanas a medicamentos recibidos por CITUC durante el año 2022.

**Método:** Se realizó un estudio transversal con las llamadas recibidas durante el año 2022. Se analizaron solo casos que incluían al menos un producto farmacéutico. **Resultados:** Se registraron 22.351 reportes, que constituyen un 70,6% del total de llamados; un 66,3% de ellos, estaban asociados a una circunstancia suicida, teniendo la mayor incidencia en este grupo la población adulta (61,3%) y adolescente (35,7%), mientras que un 21,4% son casos accidentales, siendo el mayor número de casos en pre-escolares (64,4%). En el 97,4% del total de reportes, la vía de exposición era la ingestión. Los adolescentes presentan un Odds Ratio (OR) de 2,142 (IC 95%: 1,907 – 2,407) de tener una exposición en dosis tóxicas comparado con el resto de la población y las exposiciones en contexto suicida tuvieron un OR de 7,402 (IC 95%: 6,844 – 8,006) de presentar dosis tóxicas en comparación al contexto accidental. Los medicamentos que actúan sobre el SNC alcanzaron un 53,8%. Los tres agentes más frecuentes son paracetamol, quetiapina y clonazepam. **Conclusión:** Las intoxicaciones con productos farmacéuticos representaron la mayor proporción de los casos recibidos, siendo la circunstancia suicida la de mayor incidencia. Es preocupante que las exposiciones intencionales presentan una posibilidad mucho mayor de alcanzar dosis tóxicas (OR=7,402). Las exposiciones accidentales a medicamentos ocurren en su mayoría en menores de 5 años, por lo que es primordial implementar medidas de prevención dirigidas a los padres para así lograr evitar consecuencias potencialmente graves.

**Palabras clave:** Intoxicaciones, Centros Toxicológicos, Medicamentos, Productos farmacéuticos, Toxicología.

**Moderadores:** Dra. Emma Martínez López y Dr. Francisco Soler Rodríguez.

### TA-O1) PRESENCIA DE MICROPLÁSTICOS EN LA PLAYA DEL GORGUEL (MURCIA) Y SUS EFECTOS TÓXICOS EN SOLANUM LYCOPERSICON Y ALLIUM CEPA.

Vanessa Aranda Quirós

Área de toxicología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, vanessa.aranda@uca.es

Uno de los problemas medioambientales que más preocupación está causando en los últimos tiempos, es la contaminación por microplásticos, los cuales han sido detectados en suelos, agua de mares, ríos, lagos y océanos, aire, e incluso en los seres vivos. Determinar el nivel de contaminación por microplásticos que sufren los distintos compartimentos ambientales contribuye a conocer los posibles efectos tóxicos que estos pueden tener sobre los distintos organismos. Por todo esto, en este trabajo se ha determinado y cuantificado la presencia de microplásticos en la Playa del Gorguel, zona con alto valor ecológico (reconocida por la RED NATURA 2000 y catalogada como LIC Y ZEPA) por albergar especies de plantas clasificadas como “vulnerable”, con el fin de evaluar como la presencia de este contaminante puede afectar a la conservación de los ecosistemas y su biodiversidad. Para ello, se han evaluado los efectos causados por la exposición a microplásticos procedentes de tapones de plástico encontrados en dicha playa, sobre la germinación y el crecimiento de *Solanum lycopersicon* y *Allium cepa*. Las concentraciones utilizadas en los ensayos se seleccionaron a partir de los datos de abundancia de microplásticos encontradas en la playa objeto de estudio. Estas fueron: 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 y 64 mg/mL. Tras 14 días de exposición, se analizaron los resultados. En el caso de la germinación, no se observaron diferencias significativas entre el control y las diferentes concentraciones de microplásticos en ninguna de las dos especies estudiadas. Mientras que la elongación de ambas especies se vio alterada por la presencia de microplásticos al observarse diferencias significativas entre el control y algunas de las concentraciones más altas del contaminante. *Allium cepa* mostró una mayor sensibilidad a la exposición a microplásticos que *Solanum lycopersicon*.

**Palabras clave:** microplásticos, *Solanum lycopersicon*, *Allium cepa*

### TA-O2) ENVIRONMENTAL AND TEMPORAL VARIATION OF TOTAL ARSENIC IN TOPSOILS FROM ALCALÁ DE HENARES (SPAIN) AND STRATEGIES FOR REMEDIATION

Peña-Fernández A1, Higuera M2, Lobo-Bedmar MC3

1Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK. 2Scientific Computation & Technological Innovation Center (SCoTIC), Universidad de La Rioja, Logroño, Spain. 3 IMIDRA. A-2 Km, 38.2, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

A comprehensive environmental study carried out in urban/industrial/garden topsoils across Alcalá de Henares (Spain) in 2001 highlighted an increased risk of developing cancer following oral exposure to As. Ninety topsoil (66 urban, 24 industrial, 4 garden) samples were collected in July 2017 to gain current information on the presence/distribution of this pollutant and characterise if any risks remain of concern. Total-As was analysed by ICP-MS (LoD=0.07 mg/kg); data was compared with topsoils collected in the same locations in 2001 (n=119; 97, 22 and 18, respectively). Levels increased in urban/industrial areas, respectively (data presented as mean averages, in mg/kg, and increase percentages): 5.69 vs. 4.83 (17.8%) and 7.66 vs. 6.63 (15.53%), which would be logical due to the persistence of As and its compounds in soils. In contrast, total-As content experienced some reduction in gardens [8.105 vs. 8.899 (-8.92%)], perhaps due to the lower number of samples collected in 2017. Levels were significantly higher in the industrial/garden areas (p-value=6.99E-05), as well as in those urban (p-value=0.0006) and industrial subareas (p-value=0.0133) that support more industries. The environmental distribution of As found might be attributed to its different industrial uses in Alcalá, in conjunction with the industrial growth experienced by this city and the historic relevance that the glass/ceramic industry has had in this region.

The content of organic matter (6.09 vs. 3.18, 3.27, 3.74 %) and clay (27 vs. 21.25, 21, 16 %) in the monitored sub-areas could also explain the distribution found, significantly higher in the most industrialised areas, since As and its compounds tend to be absorbed in these soil components. Owing to its complex environmental distribution, the use of a phytostabilisation strategy using a combination of herbaceous/woody ornamental plants (e.g. evergreen ornamental shrubs) could be useful to reduce the migration ability of As in soil and its translocation into plants.

**Keywords:** Arsenic, topsoils, urban areas, risks, Alcalá de Henares.

#### VE-O1 NIVELES DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN TEJIDO ADIPOSEO DE LOBOS (*Canis lupus*) DEL NOROESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.

A. González-Martín<sup>1</sup>, J. García-Muñoz<sup>1\*</sup>, A. López-Beceiro<sup>2</sup>, L.E. Fidalgo<sup>2</sup>, M.P. Míguez<sup>1</sup>, S. Martínez-Morcillo<sup>1</sup>, F. Soler<sup>1</sup>, M. Pérez-López<sup>1\*</sup>.

*1* Unidad de Toxicología, Facultad de Veterinaria (UEX). Avda de la Universidad s/n. 10003 Cáceres. *2* Dpto de Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad de Veterinaria (USC). Avda Carballo Calero s/n. 27002 Lugo. \*jgarcialam@alumnos.unex.es

Los plaguicidas organoclorados poseen enorme interés ambiental, ya que pueden ser transportados a largas distancias, presentan elevada resistencia al metabolismo y son altamente tóxicos para los seres vivos. Estudiar sus concentraciones en mamíferos predadores situados en la parte superior de las cadenas tróficas (como el lobo) resulta de gran utilidad para la biomonitorización del ecosistema y para evaluar la influencia que ciertos factores endógenos (como el sexo) puedan tener en sus niveles, añadiendo otro factor relevante al estudio ecotoxicológico. En el presente trabajo se identificaron las concentraciones de pesticidas organoclorados en tejido adiposo de 77 lobos ibéricos (35 hembras y 42 machos), remitidos muertos a los centros de recuperación de fauna salvaje de Galicia. Tras el proceso de extracción sobre dichas muestras, la cuantificación se llevó a cabo por medio de GC-MS, asegurando la validez del procedimiento analítico en todo momento. Los niveles medios más altos identificados correspondieron al HCH- $\alpha$  (118'29  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido lipídico), aunque poseyendo escasa representatividad, al detectarse en una única muestra. El segundo fue el HCH- $\beta$  (38'15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido lipídico). Los siguientes pesticidas detectados en el presente estudio a unas mayores concentraciones medias fueron Endosulfán II, DDT 4,4' y Endosulfán I, con valores de 4'28, 2'73 y 1'69  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido lipídico, respectivamente, siendo identificados cada uno de ellos en 19, 24 y 3 muestras. También, a pesar de su menor valor medio (1'28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de tejido lipídico), destacó la presencia de lindano, detectado en 17 muestras. En cuanto a la influencia del sexo, los valores medios de estos contaminantes en hembras fueron en general mayores respecto a los machos, con diferencias estadísticamente significativas para el Endosulfán II y el HCH-  $\beta$ , mientras que solamente las concentraciones de DDT 4,4' fueron significativamente más elevadas en los machos.

**Palabras clave:** Ecotoxicología, lobo, organoclorados, biomonitorización, Galicia.

#### VE-O2 INTOXICACIÓN MIXTA POR CARBOFURANO Y RODENTICIDAS EN MILANO REAL.

Ocampo Martín, David (1); Galán-Carrillo, M. (2), Pérez-López, M. (1); Míguez-Santiyan, M.P. (1); Martínez-Morcillo, S. (1); García-Muñoz, J. (1); Soler-Rodríguez, F. (1);

*1* Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres 2 CR Los Hornos, Junta de Extremadura  
E-mail de contacto: daocampom@unex.es

La intoxicación de la fauna silvestre, tanto accidental como deliberada, es un problema común en muchas regiones del mundo. En la Comunidad Autónoma de Extremadura, donde se encuentra una gran riqueza faunística, estos casos son particularmente preocupantes por la incidencia sobre especies amenazadas, estando penado por la ley el uso de cebos envenenados debido a su impacto masivo y no selectivo en la

conservación de las especies. Durante el primer trimestre del año 2023, la Unidad de Toxicología de la Universidad de Extremadura recibió dos casos de supuestos envenenamientos de milanos reales que merecen ser resaltados. En el primer caso, se encontró al ave en el casco urbano de una población cacereña, observándose durante la necropsia un cuadro congestivo hemorrágico generalizado, propio de rodenticidas anticoagulantes. Además, en el aparato digestivo se observaron microgránulos oscuros sospechosos, cuyo análisis en cavidad oral y de estómago reveló la presencia de carbofurano en altas concentraciones. También se detectó en hígado, donde además comprobó la presencia de 4 rodenticidas anticoagulantes (predominando difenacum y brodifacum), cuya concentración total fue >500 ng/g. El segundo caso afectó a dos milanos reales, que se encontraron muertos en el campo al lado de un mirlo depredado, que se confirmó que era un cebo envenenado elaborado con carbofurano. El análisis del contenido gástrico e hígado de los milanos confirmaron la presencia de carbofurano, y en el hígado en uno de ellos se encontró brodifacum a muy alta concentración. Estos casos resaltan la importancia del análisis toxicológico completo en las muestras sospechosas de envenenamiento. Además, resultan especialmente interesantes al ser intoxicaciones mixtas en las que estaban implicados en ambos casos un insecticida carbamato (carbofurano) y rodenticidas anticoagulantes.

**Palabras clave:** Intoxicación; Carbofurano; Rodenticidas; Milano real; Fauna silvestre

### COMUNICACIONES TIPO CARTEL

#### SA-C1) ESTUDIO DE LA CAPTACIÓN Y EFECTOS CITOTÓXICOS DE LA ANATOXINA-A EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Plata-Calzado C, Prieto AI, Jos A, Cameán AM.

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

La anatoxina-a (ATX-a) es una cianotoxina con distribución mundial, conocida principalmente por su neurotoxicidad. No obstante, estudios recientes han descrito efectos adversos en células inmunes y a otros niveles tras la exposición a esta toxina. Sin embargo, el número de estudios sobre los efectos tóxicos producidos por ATX-a en líneas celulares establecidas es limitado. Por ello, el objetivo del presente trabajo se centra en la evaluación de la captación y potencial citotoxicidad in vitro de ATX-a pura en diferentes líneas celulares establecidas. En concreto, se emplearon líneas celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y y N2a), de carcinoma hepático (HepG2), de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2) y del sistema inmunitario (THP-1, Jurkat y L5178YTk±). La captación de ATX-a se analizó midiendo sus niveles en el interior y el exterior de las células mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS). Para evaluar la citotoxicidad se realizó el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfonil]-2H-tetrazolio) (MTS) tras la exposición de las células a ATX-a pura (0-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 h. Se detectó ATX-a en el interior de las líneas celulares neuronales y del sistema inmunitario (entre un 1,1 y 7,7% del total de toxina añadida), mientras que en las células Caco-2 y HepG2 sólo se detectó ATX-a en la fracción extracelular. Además, ATX-a no produjo una disminución en la viabilidad en ninguna de las líneas celulares ensayadas. Estos datos sugieren que la ATX-a podría requerir un mecanismo de entrada específico a nivel celular no descrito hasta la fecha. Por ello, son necesarios más estudios sobre el mecanismo de entrada de ATX-a para seleccionar de forma adecuada los modelos experimentales in vitro para la evaluación de su toxicidad.

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-104890RB-I00/AEI /10.13039/501100011033) por la financiación, y la Junta de Andalucía (contrato PREDOC\_00447) por la ayuda predoctoral concedida a C. Plata-Calzado.

**Palabras clave:** Anatoxina-a, in vitro, viabilidad celular, citotoxicidad, absorción

**SA-C2) ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS IN VITRO DE COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS BIOACTIVOS: ESTADO DEL ARTE**

Cascajosa-Lira A1, Andreo-Martínez P2, Prieto A11, Baños A3, Guillamón E3, Jos A1, Cameán A1\*.

*IÁrea de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. 2Departamento de Química Agrícola, Facultad de Química, Universidad de Murcia, España. 3DMC Research Center, Granada, España. (camean@us.es)*

Los compuestos organosulfurados son metabolitos secundarios producidos por especies de *Allium*, los cuales presentan importantes actividades biológicas. En los últimos años, se ha incrementado su uso en la industria agroalimentaria como sustituto de los conservantes sintéticos, lo que aumenta el potencial de exposición acumulativa en los consumidores. Por tanto, es necesario realizar una evaluación de seguridad antes de su aplicación en la industria alimentaria según las especificaciones de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. En este contexto, el presente trabajo revisa la literatura científica sobre la toxicidad in vitro de los OSC según las directrices PRISMA para revisiones sistemáticas. Se realizaron búsquedas en cuatro bases de datos electrónicas de investigación (Web of Science, Scopus, Science Database y PubMed) y se seleccionaron un total de 43 trabajos de acuerdo con criterios predeterminados de inclusión y exclusión. Se incluyeron diferentes elementos de datos y se evaluó el riesgo de sesgo para cada estudio. Actualmente, hay muy pocos estudios in vitro enfocados en investigar la toxicidad de los OSC. La mayoría de los estudios de investigación se han centrado en evaluar la citotoxicidad de los OSC para dilucidar sus efectos antiproliferativos, utilizando líneas celulares cancerosas como principal modelo experimental. El disulfuro de dialilo (DADS) es el compuesto más estudiado, seguido del trisulfuro de dialilo (DATS), el sulfuro de dialilo (DAS), la alicina y el ajoeno. Solo cuatro estudios se han realizado específicamente para explorar la seguridad de los OSC para aplicaciones agroalimentarias y la evaluación de la genotoxicidad es limitada. Por tanto, se necesitan más estudios de toxicidad de los OSC para garantizar la seguridad de los consumidores.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la junta de Andalucía por la financiación del proyecto (P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**Palabras clave:** Compuestos organosulfurados, citotoxicidad, genotoxicidad, in vitro, revisión sistemática.

**SA-C3) LIQUID-LIQUID EXTRACTION ASSISTED BY SALTING OUT TO DETECT MYCOTOXINS IN WATER FROM THE RICE PRODUCTION CHAIN**

Lima da Silva, J1, Izzo, L2, Rodríguez-Carrasco, Y3; Ruiz, MJ3; Garda-Buffon, J1, Ritieni, A2

*1Mycotoxins and Food Science Laboratory, School of Chemistry and Food, Federal University of Rio Grande, Brazil; 2Food Lab, Pharmacy Department, Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy; 3 Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain julianelima@furg.br*

Rice is consumed daily by approximately 75% of the world's population. Although demand for rice production is increasing with population growth, about 15% of harvested rice is lost every year, since critical harvest and post-harvest operations may provide favorable conditions for contamination by deleterious agents. Contamination by mycotoxins may affect grains' safety, quality and properties, being considered an ongoing global concern. However, a not very common concern is the incidence and fate in the environment. Irrigated rice cultivation system covers the field with water until a certain stage of grain development. Water is also needed for the parboiling process, in which 4 L of water is required to produce 1 kg of rice. The probable migration of mycotoxins to water in irrigation and grain parboiling processes may implicate the quality of this water that is diffused by the hydric environment, which can compromise animals, humans and

environmental health. Within this context, this initial study aimed to validate an analytical method for the determination of ochratoxin A (OTA) and aflatoxin B1 (AFB1) in water from the rice production chain. Liquid-liquid extraction assisted by salting out was applied using acetonitrile acidified with 0.1% acetic acid (v/v), MgSO<sub>4</sub> and NaCl. Quantification was performed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. LOQs were 0.78 ppb for both compounds. Additionally, was possible to observe good linearity since the mycotoxins showed correlation coefficients of at least 0.999. The reliability of the method and equipment quantification were evaluated according to responses in terms of recovery, which was 80 and 72% for AFB1 and OTA, respectively. Recoveries are considered adequate and satisfactory for trace analysis in foods by parameters described in validation guides. As a conclusion and future perspective, the method validated is able to evaluate mycotoxins occurrence in water.

**Keywords:** OTA, AFB1, analytical validation, Q-Exactive.

**SA-C4) COPPER, MAGNESIUM AND MANGANESE CONTENT OF ALCOHOLIC AND NON-ALCOHOLIC BEER FROM MADRID REGION, SPAIN**

Peña-Fernández A1, Lobo-Bedmar MC2, Evans MD1

*1Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK; 2Departamento de Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca el Encín, Ctra. Madrid-Barcelona Km, 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.*

Knowledge of trace element content in beverages is pivotal for calculating the dietary intakes of essential/toxic metals to evaluate human exposure. We have studied the content of three essential minerals [copper (Cu), magnesium (Mg) and manganese (Mn)] in nine different bottles of a popular brand of beer from the Comunidad de Madrid (Spain): 5 alcoholic and 4 non-alcoholic. One ml of each sample was mineralised with 4 ml 65% HNO<sub>3</sub>/ 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; metals were monitored by ICP-MS following appropriate procedures. The limits of detection were 0.0005, 0.0050 and 0.0005 µg/ml, respectively. The concentrations of Cu, Mg and Mn, which were detected in all samples, were as follows (median and ranges, in µg/ml), for alcoholic [0.0223 (0.0172-0.0250), 28.1983 (27.5790-30.3739), 0.0318 (0.0250-0.0346)] and non-alcoholic beer [0.0141 (0.0132-0.0157), 16.3192 (16.2255-16.4747), 0.0197 (0.0190-0.0224)]. Levels were higher in the alcoholic beer, which could be attributed to differences in the brewing/manufacturing process, e.g. reverse osmosis and filtration. The content of the three metals were slightly lower but within the same ranges as those reported in beer from Granada, Spain. Levels of Cu were also below the permissible limit in wine (1 mg/L) set by the international organisation for grapes and wine. Daily intakes were calculated multiplying the mean elemental content in each type of beer/sample by the daily consumption of alcoholic beer reported in Spain (149 ml/person). Thus, the daily dietary intakes for each element were (in µg/person; Cu, Mg and Mn respectively) as follows for alcoholic (3.225, 4244.81, 4.495) and non-alcoholic (2.137, 2434.63, 3.036) beer. The percentages that they would cover of the established RDAs (0.9, 420 and 2.3 mg day<sup>-1</sup> person<sup>-1</sup>) for consumers of alcoholic beer are low: 0.36, 1.01, 0.13%. Our results would suggest that beer, on its own, would not constitute a significant source of these essential minerals.

**Keywords:** essential minerals, beer, alcoholic and non-alcoholic, Spanish population

**SA-C5) CONTENIDO DE ACRILAMIDA EN CHIPS VEGETALES Y ESTRATEGIAS DE REDUCCIÓN**

Sebastiá A., Ramon-Masarell F., Berrada, H., Ferrer, E.

*Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia, e-mail: Emilia.ferrer@uv.es*

La elaboración de snacks más saludables a partir de nuevas matrices alimentarias ofrece al consumidor un producto con un perfil nutricional

más interesante que la tradicional patata, así como una nueva variedad de sabores. A diferencia de otras matrices de origen vegetal, los productos provenientes de las patatas (patatas fritas y chips), han sido matrices ampliamente estudiadas en relación con su alto contenido en acrilamida (AA) (1,2). La AA es un compuesto tóxico proveniente de la reacción de Maillard formado durante el procesado de los alimentos (3). El presente estudio tiene como objetivo realizar una revisión bibliográfica sobre los datos disponibles acerca del contenido de AA en chips vegetales provenientes de matrices alternativas a la patata, así como de los métodos utilizados para reducir su contenido. Las matrices más estudiadas son la zanahoria, la chirivía, la remolacha y el boniato. La zanahoria presenta niveles similares del contenido de AA respecto a las chips de patata (117 – 3090 µg/gk), en cambio, la chirivía presenta los niveles más bajos. A lo largo de la cadena alimentaria se aplican en las patatas diferentes estrategias de mitigación para reducir su presencia en el producto final. No obstante, son escasos los estudios acerca de estas estrategias en los chips vegetales. Las estrategias estudiadas para su reducción se aplican antes y durante el proceso de fritura (4,5). Debido a los pocos datos disponibles, se necesitan más estudios en estas matrices alimentarias que evalúen la AA y otros productos tóxicos de la reacción de Maillard.

**Palabras clave:** Acrilamida, chips vegetales, niveles, mitigación, review.

**Agradecimientos:** Programa de la Universidad de València “Atracció de Talent” (UV-INV-PREDOC-1916102), Proyecto AICO/2021/037 (MIMATEC X PEF) de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat valenciana y Proyecto del Ministerio de Ciencias e Innovación PID2020-115871RB-I00-ALI.

#### Referencias

1. Mesias M, Delgado-Andrade C, Morales FJ. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019;79:114–21.
2. Tajner-Czopek A, Kita A, Rytel E. *Applied Sciences*. 2021;11(9).
3. EFSA CONTAM Panel. *EFSA J*. 2015 Jun 1;13(4104):321.
4. Mesías M, Delgado-Andrade C, Morales FJ. *J Sci Food Agric*. 2019;99:2048-2051
5. Lim PK, Jinap S, Sanny M, Tan CP, Khatib A. *J Food Sci*. 2014 Jan;79(1).

#### SA-C6) EFECTOS INMUNOMODULADORES DE ARSÉNICO, CADMIO Y SUS COMBINACIONES CON CILINDROSPERMOPSINA EN LA LÍNEA DE LINFOCITOS HUMANOS JURKAT.

Antonio Casas-Rodríguez<sup>1</sup>, Tjasa Sentjerc<sup>2</sup>, Leticia Díez-Quijada<sup>1</sup>, Silvia Pichardo<sup>1</sup>, Bojana Zegura<sup>2</sup>, Ángeles Jos<sup>1</sup>, Ana M. Cameán<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup> Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España <sup>2</sup> Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia.

La Cilindropermopsina (CYN) es una cianotoxina producida por cianobacterias que tiene cada vez más relevancia a nivel mundial debido a su amplia distribución, a su capacidad de bioacumulación y a sus efectos tóxicos. Estudios previos sugieren que existe una interacción entre estas toxinas y otros contaminantes químicos. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el impacto del arsénico (As), cadmio (Cd) y sus combinaciones con CYN en la línea de linfocitos humanos Jurkat. Para ello se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad mediante el ensayo MTS. As y Cd redujeron significativamente la viabilidad de las células tras la exposición durante 24 horas, obteniendo concentraciones efectivas 50 (CE50) de 13.15 y 36.92 µM, respectivamente. Las interacciones entre estos contaminantes y CYN se evaluaron mediante el método de los isobogramas, obteniendo en ambos casos una relación de antagonismo con la toxina. Además se llevó a cabo el estudio de los mecanismos de muerte celular (apoptosis/necrosis). Los resultados muestran aumentos concentración-dependientes en el número de células apoptóticas tras la exposición a la mezcla de As+CYN y Cd+CYN. El número de células necróticas no varió significativamente. Por último se estudió el efecto en la expresión de ARNm de diferentes interleuquinas (IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α e INF-γ). El Cd produjo un aumento significativo de la

expresión de todos los genes, mientras que la exposición a As sólo incrementó la expresión de IL-8. La exposición a las combinaciones aumentó la expresión de IL-2 e INF-γ, mientras que en los demás genes se encontró una disminución de la expresión respecto al control. Estos resultados sugieren que las mezclas de contaminantes producen efectos diferentes a las de los tóxicos individuales, lo que se debería tener en cuenta para una correcta evaluación del riesgo.

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICINN) (PID2019-104890RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) por su financiación. Antonio Casas-Rodríguez agradece al MICINN por su beca predoctoral (PRE2020-094412) y L. Díez-Quijada agradece a la Junta de Andalucía la concesión de la beca Posdoctoral (POSTDOC\_21\_00130). Los autores agradecen al VII Plan Propio de Investigación de la US por la concesión de la ayuda para el uso de los Servicios Generales de Investigación (CITIUS-VIIPPIT-2023-I.3).

**Palabras clave:** Cilindropermopsina, arsénico, cadmio, Jurkat

#### SA-C7) INFLUENCIA DE LA CILINDROSPERMOPSINA Y LA MICROCISTINA-LR SOBRE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN CÉLULAS HELA (OCDE 455)

Antonio Casas-Rodríguez<sup>1</sup>, María Puerto<sup>1\*</sup>, Ángeles Jos<sup>1</sup>, Ana M. Cameán<sup>1</sup>. (mariapuerto@us.es)

<sup>1</sup> Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Sevilla, España

En los últimos años, el aumento de la eutrofización del agua, las actividades antropogénicas y el cambio climático han producido un incremento de las cianobacterias. Estas bacterias pueden producir una amplia gama de cianotoxinas que llegan al ser humano principalmente por vía oral a través del consumo de agua y alimentos contaminados. Entre las cianotoxinas, la cilindropermopsina (CYN) y la microcistina-LR (MC-LR) son las más relevantes a nivel mundial debido a su amplia distribución, capacidad de bioacumulación y efectos tóxicos. Las cianotoxinas han sido propuestas como potenciales disruptores estrogénicos por su potencia estrogénica y capacidad de interferencia en la señalización de receptores intracelulares importantes para la regulación hormonal y la reproducción. El objetivo de este trabajo fue evaluar in vitro las propiedades agonistas/antagonistas de CYN y MC-LR sobre el receptor de estrógenos (RE). Para ello, se siguió el protocolo de la OCDE 455, utilizando las células Era-HeLa-9903. Primero se realizó una prueba de citotoxicidad (ensayo MTS) para determinar las concentraciones no citotóxicas tanto de CYN como de MC-LR. A continuación, se llevaron a cabo ensayos de luciferasa para determinar el papel agonista/antagonista de las toxinas sobre el RE. En cuanto a los resultados para el ensayo de agonistas, ninguna toxina mostró tener efectos sobre el RE en las condiciones ensayadas. Sin embargo, respecto al ensayo de antagonistas, la CYN y MC-LR parecen ejercer efectos antagonistas sobre el RE a la concentración más alta ensayada, 2.5 µM y 200 µM, respectivamente. Es necesario realizar más ensayos para esclarecer la influencia que pueden ejercer ambas toxinas sobre el RE.

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICINN) (PID2019-104890RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) por su financiación. Antonio Casas-Rodríguez agradece al MICINN por su beca predoctoral (PRE2020-094412). Los autores agradecen al VII Plan Propio de Investigación de la US la concesión de la ayuda para el uso de los Servicios Generales de Investigación (CITIUS-VIIPPIT-2023-I.3).

**Palabras clave:** Cilindropermopsina, Microcistina-LR, HeLa, Receptor de estrógenos

#### SA-C8) EL EFECTO PROTECTOR DE LA GENTIANA LUTEA CONTRA LA INMUNOTOXICIDAD DE BEA IN VITRO

M. Frangiamone<sup>1</sup>, G. Di Matteo<sup>2</sup>, A. Cimbalo<sup>1</sup>, L. Mannina<sup>2</sup>, L. Manyes<sup>1</sup>, G. Font<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Spain <sup>2</sup> Department of Chemistry and Technology of Drugs, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy *massimo2.frangiamone@uv.es*

La beauvericina (BEA) es una micotoxina emergente producida por algunas especies del género *Fusarium* que contamina ampliamente alimentos y piensos. El mecanismo de acción de BEA se asocia a la actividad ionofórica, que aumenta la permeabilidad iónica en las membranas biológicas induciendo estrés oxidativo e inflamación. La *Gentiana lutea* (GL) es una planta medicinal conocida por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, que se atribuyen a su alto contenido en polifenoles totales. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto beneficioso de la GL contra la citotoxicidad de BEA en células Jurkat mediante un enfoque proteómico. Para llevar a cabo el experimento, las células se expusieron a digeridos intestinales de GL individualmente o combinados con el estándar BEA (100 nM), disueltos en disolvente orgánico (0,1% DMSO) durante 7 días. Se evaluaron estadísticamente las proteínas expresadas diferencialmente (DEPs) ( $p < 0,05$ ) reportando un número total de 172 DEPs con respecto al control en las células expuestas al estándar BEA, 145 DEPs para la condición GL y 139 DEPs al exponer las células al tratamiento combinado. El análisis bioinformático mediante la base de datos DAVID reveló procesos implicados en la mitocondria, la actividad relacionada con el ATP y la unión al ARN. El análisis de las DEPs evidenció que la GL atenuó el efecto negativo de BEA sobre la expresión de proteínas mitocondriales. Además, la GL disminuyó la actividad de las principales oncoproteínas implicadas en la modulación de la función

inmunitaria. Por lo tanto, el presente estudio demostró el papel quimiopreventivo de la GL, que podría integrarse, tras la evaluación in vivo, como suplemento dietético para proteger la salud humana a nivel inmunológico.

**Palabras clave:** *Gentiana lutea*, micotoxinas, proteómica, linfocitos T humanos, polifenoles

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-108070RB-I00-ALI).

#### SA-C9) EFECTOS DEL ALLIUM SATIVUM L. VAR. VOGHIERA EN LA BIOACCESIBILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE LA AFLATOXINA B1

Lázaro A1, Frangiamone M1, Juan Quiles1, Maietti A2, Cimbalò, A†, Vila-Donat P1, Manyes L1, Font G1

*ILaboratorio de Ciencias de los Alimentos y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, 46100 Burjassot, València, España. 2Univ Ferrara, Departamento de Química Farmacéutica & Agr Sci, Via Luigi Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italia alvaro.lazaro@uv.es*

La aflatoxina B1 (AFB1) es el riesgo de salud pública más importante relacionado con la presencia de micotoxinas en los alimentos. Se ha demostrado que hay algunos compuestos bioactivos naturales que tienen la capacidad de reducir la bioaccesibilidad de AFB1 y por lo tanto, sus efectos, tales como suero de leche, leche fermentada, calabaza, inulina, oligofruktosa,  $\beta$ -glucano y limón. El ajo de Voghiera ha sido elegido para este estudio debido a sus efectos beneficiosos vinculados a las propiedades antioxidantes. El presente estudio se centra en la evaluación de la bioaccesibilidad y citotoxicidad AFB1 in vitro utilizando pan digerido con ajo de Voghiera fresco (2%) o no. El pan fue horneado usando harina contaminada controlada en el laboratorio. Los digeridos gástricos e intestinales fueron medidos por HPLC-FLD. En cuanto al digerido gástrico, la concentración de AFB1 fue de 0,176 0,005 (A) y 0,191 0,005  $\mu$ M (A+G) para E1; y 3,934 0,823 (A) y 3,861 0,006  $\mu$ M (A+G) para E2. En el digerido intestinal, la concentración de AFB1 fue de 0,181 0,002 y 0,162 0,001  $\mu$ M para el E1; y 8,621 0,021 y 7,742 0,031  $\mu$ M para el E2. Los resultados mostraron que la biodisponibilidad del AFB1 disminuyó en función de la dosis y la presencia de ajo contribuyó a su reducción (7-8 %). El ajo demostró aumentar la viabilidad celular (9-18 %) en células diferenciadas de Caco-2 mediante el ensayo MTT. Por citometría de flujo, el ajo demostró mitigar los efectos de AFB1 en las células Jurkat-T en el ciclo celular (mitigando la detención de las fases S y G2/M) y en la apoptosis/necrosis, ROS celular y ROS mitocondrial al reducirlos en 35%, 71% y 25% respectivamente. El ajo parece contribuir a aliviar

la presencia y los efectos del AFB1a múltiples niveles.

**Palabras clave:** micotoxina, compuestos bioactivos, digestión in vitro, viabilidad celular, citometría de flujo

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación ha financiado este proyecto (PID2019-108070RB-I00 ALI) 2020-2023.

#### SA-C10) DETERMINACIÓN DE AFLATOXINA B1 Y OCRATOXINA A EN EXCREMENTOS DE RATAS WISTAR EXPUESTAS A DIETAS NATURALMENTE CONTAMINADAS

Vila-Donat P, Sánchez D, Manyes L, Font G.

*Laboratorio de Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, España Pilar.vila@uv.es*

La presencia de micotoxinas en alimentos y piensos representa uno de los principales problemas de seguridad alimentaria. La aflatoxina B1 (AFB1) y la ocratoxina A (OTA) son las más tóxicas. La adición de compuestos bioactivos como suero de leche de cabra fermentado (S) y calabaza (C) a alimentos podría contrarrestar los efectos adversos de estas micotoxinas. El año pasado, 120 ratas Wistar (12 grupos,  $n=10$  (5 de cada sexo)), fueron expuestas durante 28 días a dietas naturalmente contaminadas con AFB1 (4-5 mg/kg) y OTA (5-9 mg/kg), con y sin ingredientes bioactivos (S y C). Cada semana, las ratas fueron trasladadas a una jaula metabólica (24h) para recolectar los excrementos. El objetivo de este trabajo fue analizar las 120 muestras recogidas la última semana del estudio y evaluar el efecto del S y la C sobre la excreción de micotoxinas. La extracción y análisis de AFB1 y OTA se realizó mediante el uso combinado de columnas de Inmunofinidad (IAC) AflaOchra y un método analítico de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD), previamente validado ( $R^2 > 0,999$ , %  $R > 75$ , LOD = 0,2 ng/mL y 0,1 ng/g, en orina y heces, respectivamente). Los niveles encontrados en orina fueron: 77-162 ng AFB1/mg creatinina y 508-1199 ng OTA/mg creatinina; los niveles encontrados en heces fueron: 40-165  $\mu$ g/kg AFB1 y 400-860  $\mu$ g/kg OTA. El S incrementó la concentración de AFB1 en orina, mientras que la combinación de S + C disminuyó el nivel de AFB1 y OTA; en heces, tanto el S como la combinación de S + C, aumentaron la concentración de AFB1 y disminuyeron los niveles de OTA, demostrando que los compuestos bioactivos tienen un efecto sobre la excreción de micotoxinas, con comportamientos dependientes del sexo de las ratas, de la micotoxina administrada (sola o combinada), y la dosis.

**Palabras clave:** micotoxinas, orina, heces, ratas, HPLC-FLD

**Agradecimientos:** Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-108070RB-I00-ALI).

#### SA-C11) EVALUACIÓN DE FACTORES EXTRÍNSECOS EN LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS Y METABOLITOS EN ORINA DE MUJERES

Dasi-Navarro N.1, Lombardi S.2, Lozano M.1, Ritieni, A.2, Manyes L.1, Font G.1

*ILaboratorio de Química de los alimentos y Toxicología, Facultad de Farmàcia, Universitat de València, Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot, 46100 España; 2Departamento de Farmacia, Universidad de Nápoles Federico II, Via Domenico Montesano 49, Nápoles, 80131, Italia. nuria.dasi@uv.es*

Los estudios de biomonitorización son una herramienta clave para evaluar la exposición humana a micotoxinas y otros contaminantes, ya que tienen en cuenta varios factores además de la dieta, y aportan una visión global de la exposición real de cada individuo. La toxicidad y efectos perjudiciales de las micotoxinas legisladas como las aflatoxinas es ampliamente conocido. En cambio, los efectos sobre la salud de las micotoxinas emergentes de *Fusarium* están siendo más estudiados actualmente, ya que el conocimiento sobre sus mecanismos de toxicidad es escaso, pero se han observado efectos adversos sobre la salud. Para las eniatinas y la beauvericina, se han visto en estudios in vitro e in vivo, efectos genotóxicos, citotóxicos y neurotóxicos. El objetivo de este estudio en curso es evaluar como se ven alterados los metabolitos

presentes en la orina respecto a la exposición a micotoxinas y otros factores asociados, e investigar las rutas metabólicas afectadas. Las participantes del estudio fueron 540 mujeres de la cohorte de Valencia del proyecto INMA. Para la identificación metabólica se utilizó HPLC-Q-TOF-MS, y para el procesamiento de datos Agilent Mass Hunter Workstation con base de datos METLIN, y Agilent Mass Profiler Professional. En estudios previos se observaron concentraciones relevantes de micotoxinas emergentes, aflatoxinas y otros biomarcadores, asociados a vivir en entornos rurales, menor clase social, fumadoras pasivas y consumo de cerveza. Se pudieron identificar alrededor de 2000 metabolitos en cada muestra, y se seleccionaron aquellos con abundancias diferenciadas en cuanto a los controles (Fold Change  $\geq 2$ , p-valor ajustado  $< 0.05$ ). Se obtuvieron 530 metabolitos en las muestras con mayores niveles de eniatinas, 450 en las muestras que predominan las aflatoxinas, y 560 en muestras con otros biomarcadores. Tras el análisis bioinformático, se espera poder evaluar los efectos de la exposición a micotoxinas, especialmente las emergentes, en las rutas metabólicas y procesos celulares implicados en la salud humana.

**Palabras clave:** micotoxinas, biomonitorización, metabólica, orina, HPLC-Q-TOF-MS.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por Generalitat Valenciana (GV/2021/111), Ministerio de Universidades (CAS21/00008 and NextGeneration EU), Instituto de Salud Carlos III (FIS-FEDER: 13/1944, 16/1288, 17/00663 and 19/1338; FIS-FSE: 17/00260; Miguel Servet-FSE: MSII20/0006). Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-108070RB-I00 ALI) 2020-23. Nuria Dasí-Navarro agradece a la Generalitat Valenciana por la financiación de su contrato (EDGJID/2021/112).

#### SA-C12) CARACTERIZACIÓN, INTERNALIZACIÓN, CITOTOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO DEL ÓXIDO DE GRAFENO REDUCIDO FUNCIONALIZADO CON DODECILAMINA EN CÉLULAS HEPG2 Y CACO-2.

Óscar Cebadero-Domínguez<sup>1</sup>, Soraya Sánchez<sup>2</sup>, María Puerto<sup>1</sup>, Ana Cameán<sup>1</sup>, Ángeles Jos<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Sevilla, España <sup>2</sup> Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE), Paterna, Valencia, España (angelesjos@us.es)

La funcionalización del óxido de grafeno reducido (OGr) con agentes orgánicos como la dodecilamina (DA) ha demostrado mejorar las propiedades mecánicas, de barrera y su dispersión en polímeros biodegradables para su aplicación como material en contacto con alimentos. Sin embargo, es necesario evaluar la toxicidad antes de su uso. Por ello, el objetivo de este trabajo fue funcionalizar el OGr con dodecil amina (OGr-DA) y caracterizarlo. Mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X se determinó el contenido de carbono (88.04 At %), oxígeno (8.38 At %) y nitrógeno (3.46 At %). Presentó varios picos medidos por difracción de rayos X a  $2\theta = 11,42, 22,85, 42,46$ . El potencial Z en medio de cultivo celular fue de  $-12.67 \pm 1.31$  y  $-20.07 \pm 1.48$  en agua Milli-Q. Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) y de barrido mostraron un conjunto de láminas finas de grafeno. También se investigó la internalización mediante TEM (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y la citotoxicidad (0-100  $\mu\text{g/mL}$ ) en las líneas celulares humanas Caco-2 y HepG2 durante 24 y 48 h de exposición. Las imágenes no evidenciaron la absorción por parte de ninguna de las líneas celulares. La viabilidad celular mostró un descenso significativo a partir de 200  $\mu\text{g/mL}$  para 24 h y de 100  $\mu\text{g/mL}$  para 48 h en ambas líneas celulares. Además, se analizó la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el contenido de glutatión (GSH) durante 4, 8, 12 y 24 h. Las ERO aumentaron a partir de 8 h para todas las concentraciones de exposición y el GSH disminuyó a partir de 8 h para la concentración más elevada en ambas líneas celulares. Estos resultados revelan que es necesaria una evaluación toxicológica más amplia del OGr-DA para determinar sus riesgos para la exposición humana.

**Agradecimientos:** Proyecto P18-RT-1993 (PAIDI-2020/FEDER, Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y

Universidades, Junta de Andalucía). Ayuda del VII Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla para el uso de los Servicios Generales de Investigación (I.3) y del VI PPIT para la asignación temporal de espacios (I.8).

**Palabras clave:** Da-rGO, Caco-2, HepG2, citotoxicidad, estrés oxidativo.

#### SA-C13) EVALUACIÓN IN VITRO DE LA GENOTOXICIDAD DEL ÓXIDO DE GRAFENO REDUCIDO FUNCIONALIZADO CON DODECILAMINA

Óscar Cebadero-Domínguez, María Puerto, Ana Cameán, Ángeles Jos\*.

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Sevilla, España (angelesjos@us.es)

Algunos derivados del grafeno, como el óxido de grafeno reducido (OGr), han demostrado un gran potencial para mejorar las propiedades de los envases de alimentos. Además, su estructura permite la unión de moléculas orgánicas, como la dodecilamina (DA), para facilitar su dispersión en los envases. Sin embargo, es necesario realizar una evaluación toxicológica para garantizar su seguridad antes de su posible utilización. Por este motivo, se ha evaluado la genotoxicidad y mutagenicidad, mediante los ensayos de micronúcleos (MN) y el ensayo de linfoma de ratón (MLA), siguiendo las recomendaciones de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. En ambos ensayos se utilizó la línea celular L5178Y Tk+/- . Las células se expusieron a 0-200  $\mu\text{g/mL}$  de OGr-DA durante 4 h para el ensayo del MLA y 24 h, para el ensayo de MN. En cuanto a los resultados de MN, no se observó un aumento de la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas en ninguna de las concentraciones ensayadas en comparación con el grupo de control. Tampoco hubo diferencias significativas respecto al índice de división nuclear. Respecto al MLA, no hubo diferencias significativas en la frecuencia de mutación a ninguna de las concentraciones tras 4 h de exposición comparado con el grupo control. Estos resultados determinan que, aunque el OGr-DA no ha demostrado efectos mutagénicos ni genotóxicos, es necesaria una evaluación toxicológica más amplia para determinar sus riesgos para la exposición humana.

**Agradecimientos:** Proyecto P18-RT-1993 (PAIDI-2020/FEDER, Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía). Ayuda del VII Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Sevilla para el uso de los Servicios Generales de Investigación (I.3) y del VI PPIT para la asignación temporal de espacios (I.8).

**Palabras clave:** Da-rGO, L5178Y Tk+/-, micronúcleos, MLA.

#### SA-C14) DAÑO CELULAR INDUCIDO POR ACRILAMIDA EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y.

Bridgeman, L., Berrada, H., Juan-García, A.

Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia, e-mail. luna.bridgeman@uv.es

La acrilamida (AA) se produce en los alimentos ricos en hidratos de carbono a causa del procesado a altas temperaturas, como la fritura, tostado o el horneado. La AA está clasificada como cancerígena en el grupo 2A, según la IARC, y la exposición humana provoca una degeneración progresiva de los sistemas nerviosos periférico y central caracterizada por anomalías cognitivas y motoras. Los efectos toxicológicos del AA en los seres humanos son neurotoxicidad, genotoxicidad, toxicidad reproductiva y carcinogenicidad. La determinación de AA en cantidades considerables en una serie de alimentos consumidos diariamente ha situado la reducción y mitigación de AA en uno de los hitos primordiales de la industria alimentaria y de su cadena de suministro. Los productos de panadería (pan, pan crujiente, pasteles, rebozados, cereales de desayuno, galletas, tartas, etc.) son algunas de las principales fuentes de AA en la dieta hoy en día. En el presente trabajo, se revisan los efectos toxicológicos in vitro de la AA en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. De los estudios

seleccionados se observó que en el rango de concentraciones estudiadas fue de 0,1 a 10 mM. A las concentraciones más altas se reporta citotoxicidad, (IC50 de 5mM para las 24h) mediante el MTT, estrés oxidativo (a 5mM y 2.5 mM) a través del ensayo de 2'-7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y apoptosis (a partir de 2.5 mM) con citometría. En cuanto a las concentraciones más bajas se observaba una alteración de la expresión proteica de manera tiempo-dosis dependiente a través de qPCR y Western blot, así como una interrupción del crecimiento de las neuritas (a partir de 0.5 mM) mediante la medida y cuantificación de las neuritas.

Este trabajo ha contado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación de España PID2020-115871RB-I00; Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital. Generalitat Valenciana AICO/2021/037. LB. agradece la beca de doctorado de la Generalitat Valenciana, (CIACIF/2021/203).

**Palabras clave:** Acrilamida, toxicidad, SH-SY5Y, revisión.

### **ED-C1) “ADIVINA EL ENVENENAMIENTO”, UN JUEGO PARA APRENDER TOXICOLOGÍA A TRAVÉS DE INSTAGRAM EN EL GRADO EN CRIMINOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

Alfredo G. Casanova123\*, Marta Prieto123, Javier Tascón123, Ana I. Morales123, Laura Vicente-Vicente123

1 Unidad de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca; 2 Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL); 3 Grupo de Investigación Traslacional en Enfermedades Renales y Cardiovasculares (TRECARD), Salamanca.

\* e-mail de contacto: [alfredogcp@usal.es](mailto:alfredogcp@usal.es)

La impartición de la materia Toxicología entre alumnos del Grado en Criminología es todo un reto al tratarse de una asignatura con base científica alejada de su área de estudio. Partiendo de esta premisa, la presente actividad tuvo como objetivo incentivar el interés por la Toxicología mediante la participación en un juego denominado “Adivina el Envenenamiento”, realizado a través de la red social Instagram; y cuyo fundamento era descifrar envenenamientos “famosos” a través de preguntas que sólo podían contestarse con sí/no. Los estudiantes podían participar en el juego como directores o como detectives. Los directores desempeñaron las siguientes tareas: proponer casos de envenenamientos para resolver en forma de posts, responder a las preguntas de los detectives y elaborar stories temporales donde se describiera el caso en detalle una vez adivinado. Los detectives se encargaban de realizar preguntas (mediante comentarios en el post del caso). El juego finalizaba cuando un detective acertaba la víctima del envenenamiento y el tóxico.

Los indicadores de participación de la actividad fueron los siguientes: el 95% de los estudiantes matriculados siguieron a la cuenta de Instagram “Toxusal”, el 83% de los estudiantes matriculados participaron activamente haciendo preguntas, se resolvieron 16 casos de envenenamiento a través de 670 preguntas, y se publicaron 48 stories explicativos.

Además, se realizó una encuesta de satisfacción al finalizar la actividad, cuyos resultados principales fueron (puntuación: 1, muy poco – 5, mucho): a la hora de indicar si su participación en la actividad había sido beneficiosa, el 76,4% de los encuestados otorgaron una puntuación de 4 o más. El 91,2% consideró que la idea les había parecido muy cercana por ser usuarios activos de Instagram. En conclusión, esta actividad parece aumentar el interés por la asignatura Toxicología en el Grado en Criminología.

**Palabras clave:** Instagram; Gamificación; Docencia; Criminología

### **ED-C2) APRENDIENDO TOXICOLOGÍA EN EL GRADO EN FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA A TRAVÉS DE LA ACTIVIDAD “SEMANAS TEMÁTICAS” EN INSTAGRAM**

Laura Vicente-Vicente123, Javier Tascón123, Marta Prieto123, Ana I. Morales123, Alfredo G. Casanova123\*

1 Unidad de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca; 2 Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca

(IBSAL); 3 Grupo de Investigación Traslacional en Enfermedades Renales y Cardiovasculares (TRECARD), Salamanca.

\* e-mail de contacto: [alfredogcp@usal.es](mailto:alfredogcp@usal.es)

La Toxicología es una ciencia multidisciplinar extensa que incluye campos de estudio que pueden resultar interesantes para el estudiante del Grado en Farmacia pero que no se pueden abordar en el programa de la asignatura, orientado fundamentalmente al estudio de la toxicidad de los fármacos. El objetivo de esta actividad fue aplicar una de las redes sociales más utilizadas (Instagram) para dar a conocer estos aspectos entre los estudiantes. Esta actividad incluyó la estrategia de “aula invertida”, en la que algunos estudiantes se convirtieron en profesores que generaron material formativo digital para sus compañeros.

Durante cada semana, una pareja de estudiantes creó material audiovisual sobre un tema asignado (por ejemplo, intoxicaciones célebres históricas, venenos de animales, toxinas vegetales y fúngicas, tóxicos en el ámbito laboral, etc.). Este material consistió en posts (textos con imágenes relacionadas que explicaban detalladamente definiciones y datos relacionados con el tema), stories informativos (“collages” de imágenes y textos breves para explicar conceptos, ideas y ejemplos de aspectos relacionados con el tema asignado); y stories interactivos (preguntas de verdadero/falso, cuestionarios con cuatro posibles respuestas y preguntas de campo libre con las que los creadores de contenido pudieron “poner a prueba” los conocimientos adquiridos por sus compañeros).

En cuanto al éxito de la actividad, 130 de los 175 estudiantes matriculados siguieron la cuenta de Instagram y 104 participaron activamente haciendo preguntas y comentarios. Los resultados de la encuesta de satisfacción indicaron que el 93,3% de los encuestados consideraron esta actividad como una forma original e interesante de abordar temas relacionados con la asignatura; y el 80,0% estableció que les había permitido tener una visión más amplia de la Toxicología. En conclusión, la actividad parece haber logrado un buen grado de participación y aceptación por parte del alumnado, por lo que será incluida también en cursos futuros.

**Palabras clave:** Instagram; Docencia; Farmacia

### **ED-C3) METODOLOGÍAS ACTIVAS COMO ESTRATEGIA DOCENTE EN LA ASIGNATURA DE TOXICOLOGÍA DEL GRADO DE FARMACIA DE LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Fernández-Franzón, M., Berrada, H., Ferrer, E., Juan-García, A., Tolosa, J., Ruiz MJ.

Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia,

e-mail: [M.Jose.Ruiz@uv.es](mailto:M.Jose.Ruiz@uv.es)

Para conseguir una mayor motivación y participación de los estudiantes en el aprendizaje y el conocimiento de la asignatura de Toxicología en el Grado de Farmacia de la Universitat de València (UV), en los últimos años las profesoras del área han introducido nuevas metodologías activas en la docencia. Las docentes, con estas metodologías, estimulan al estudiante con nuevas formas de aprender, comunicar, valorar y conectar con la realidad, haciéndolo de forma interactiva y activa para que a través de la experiencia, profesoras y estudiantes tengan una formación constructiva. El presente trabajo se enfoca en analizar las estrategias docentes basadas en metodologías activas como herramientas innovadoras que estimulen al estudiante en su propia formación, en mejorar la comunicación, desarrollar conocimientos, habilidades y competencias y crear un ambiente positivo en el aula. Entre las metodologías activas aplicadas en la asignatura de toxicología del grado de farmacia de la UV se incluyen: la gamificación, clases invertidas y aprendizaje entre pares en las tutorías presenciales que se realizan con grupos pequeños de estudiantes con la profesora; just time teaching en los seminarios expositivos basados en píldoras educativas que grupos de entre 3 y 5 estudiantes preparan guiados por la profesora, y los exponen/presentan a sus compañeros con opción de realizar preguntas-respuesta; y aprendizaje basado en problemas, aprendizaje basado en retos y aprendizaje basado en acción, estrategias que se

aplican durante los 7 días de las sesiones de clases prácticas. La finalidad de estas metodologías, desde el punto de vista constructivo, es ofrecer estrategias aplicables al trabajo en aula, aumentar la motivación y el desarrollo del estudiante y del grupo, aumentar la interacción entre ellos en el aula y que tenga un impacto en el aprendizaje.

**Agradecimientos:** Proyecto de Innovación Docente RENOVIA-PID “UV-SFPIE\_PID-2079652”.

**Palabras clave:** docente, metodologías activas, estrategias docentes, motivación, coordinación

#### ED-C4) USO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DIGITALES EN LA ASIGNATURA TOXICOLOGÍA DE LAS DROGAS DE ABUSO

Cascajosa-Lira A, Diez-Quijada L, Jos A, Cameán A\*.

Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. (camean@us.es)

Durante el desarrollo del proceso educativo es de interés fomentar el uso de diferentes metodologías. Entre estos procedimientos se encuentra la gamificación, que consiste en llevar el juego a ámbitos donde no es común, en este caso, en la formación universitaria. Por ello, se implementó la utilización de la aplicación informática Quizizz en la asignatura “Toxicología de las Drogas de Abuso” del Grado en Criminología de la Universidad de Sevilla, como una prueba intermedia, que permitiese valorar los conocimientos de los alumnos. La actividad consistió en la resolución de 60 preguntas tipo test, con 4 opciones y sólo una correcta. Los alumnos contaban con un ranking proyectado en clase que les permitía saber quién iba en cabeza. El porcentaje de respuestas correctas totales fue del 69%. La pregunta que más tiempo les llevó contestar (14 segundos) con un 76% de aciertos fue: “¿Para qué se usa el formulario D con respecto a estupefacientes?”, y la que menos tiempo (5 segundos) y mayor porcentaje de aciertos tiene (96%): “¿Cuál de las siguientes es una droga lícita?”. Por el contrario, la pregunta que obtuvo más fallos fue: “¿Cuál de las siguientes sustancias se usa como precursor en la síntesis de MDMA?” con un tiempo de 8 segundos y un 30% de aciertos. Al final del juego, los alumnos se mostraron satisfechos, motivados y seguros con la actividad y las calificaciones conseguidas. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos podemos determinar que se trata de una herramienta motivadora, de estimulación y exploración, que puede ser de gran utilidad para adquirir mejor los conceptos, afianzar los conocimientos ya obtenidos y así consolidar de modo conjunto todo el temario que se imparte en la asignatura, lo cual permite su potencial utilización como herramienta de evaluación en clases teóricas.

**Agradecimientos:** Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247). Leticia Diez-Quijada Jiménez agradece a la Junta de Andalucía por la concesión de la beca Posdoctoral (POSTDOC\_21\_00130).

**Palabras clave:** Gamificación, Innovación Docente, Aprendizaje, Teoría, Toxicología.

#### ED-C5) WEB-BASED TOOLS AND RESOURCES TO PROVIDE TRAINING TO RESPOND TO CBRN EVENTS

Peña-Fernández A1, Wyke S2, Duarte-Davidson R2, Nisbet A2, Lobo-Bedmar MC3, Peña MA3

1Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK; 2Public Health England, Centre for Radiation, Chemical and Environmental Hazards, Didcot, OX11 0RQ; 3 Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona Km, 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

Our current chemical, biological, radiological and nuclear (CBRN) course was updated following the war in Ukraine in 2021/22 and tested with postgraduate students enrolled in the MSc Advanced Biomedical Science programme (De Montfort University, UK) during the last two academic courses. The updated course included different workshops, in which students needed to: a) complete clinical parasitology case studies; b) tailor a complete protection and decontamination plan to respond to different events involving emerging CB hazards; c) report

their plans and check for appropriateness. Students use the Public Health England (PHE)'s UK Recovery Handbooks<sup>1</sup> for Chemical (UKRHCI) and Biological Incidents (UKRHBI), and their associated tools (Recovery Record Forms). Each handbook presents different recovery options (ROs) or actions intended to reduce or avert exposure of people and the environment to CBRN contamination; ROs are selected based on the physicochemical/physiological characteristics of the agent(s) involved and the characteristics of the site. Students (n=15; 2021-23) considered that they learnt some environmental toxicology knowledge (78.57% agreed, 14.29% strongly agreed) and this will help their future career (85.71% agreed, 7.14% strongly agreed). These responders indicated (71.43% agreed, 14.29% strongly agreed) that they would like to learn to use the specific recovery handbooks for Radiation Incidents (UKRHRI) and associated tools. Thus, most students requested (71.43% agreed, 21.43% strongly agreed) the incorporation of a specific radiation/nuclear incident workshop to use the radiation tools. The introduction of specific radiation/nuclear response training will be explored as long-term monitoring studies carried out in forests in the Fukushima Prefecture have highlighted the need for further decontamination ten years after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident in March 2011, as radioactive cesium is accumulated in trees and soil, evidencing the need for appropriate training/capabilities to be in place to aid with the decontamination phases to respond to these events.

1 PHE recovery website: <https://www.gov.uk/government/collections/recovery-remediation-and-environmental-decontamination>

**Key-words:** CBRN training, CBRN response, environmental recovery, decontamination, guidance, tools.

#### ED-C6) EVOLUCIÓN DE LA MOVILIDAD ACADÉMICA DEL GRADO DE FARMACIA. SATISFACCIÓN DE LOS ESTUDIANTES.

Guillot, A1., Melero, A1., Fernández-Franzón, M2., Berrada, H2., Juan-García, A2., Tolosa, J2., Ruiz MJ2., Ferrer, E2.

1Laboratorio de Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universitat de València. 2Laboratorio de Toxicología. Facultad de Farmacia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Valencia, e-mail: Emilia.ferrer@uv.es

**Introducción** El programa ERASMUS tiene como objetivo aumentar el intercambio de estudiantes entre instituciones europeas de enseñanza superior proporcionando ayuda financiera a los Estados miembros. Valencia es actualmente el primer destino de los estudiantes ERASMUS en Europa. Este estudio analiza la evolución de los estudiantes ERASMUS entrantes y salientes en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia y el nivel de satisfacción de los mismos respecto al programa de movilidad.

**Método** El estudio analiza la evolución de los estudiantes de intercambio ERASMUS en la Facultad de Farmacia de la Universitat de València desde 2014 hasta la actualidad. Se analizaron un total de 356 encuestas realizadas a estudiantes ERASMUS.

**Resultados** De un total de 1079 estudiantes del Grado en Farmacia, 140 (13%) completan el programa ERASMUS durante el último año académico. Los estudiantes entrantes son siempre más numerosos que los salientes, con 181 estudiantes entrantes en el curso 2022-2023. Los resultados de la encuesta realizada a 356 estudiantes que finalizaron el grado de farmacia fueron satisfactorios. El nivel académico de la universidad de destino recibió una valoración de 4,3 sobre un máximo de 5,0. Los estudiantes consideraron que su experiencia de movilidad fue útil para sus futuras salidas profesionales, recibiendo una puntuación de 5,0. La satisfacción con los profesores de otras universidades recibió una puntuación de 4,5. En general, la satisfacción con la experiencia de movilidad recibió una puntuación de 4,4 sobre 5.

**Conclusiones** La Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia tiene actualmente una tasa de movilidad entrante y saliente del 15%. La evolución de los programas de movilidad es creciente. Los estudiantes están satisfechos con la experiencia de movilidad, destacando la mejora de sus futuras oportunidades profesionales y el adecuado

reconocimiento académico entre asignaturas.

### ED-C7) APRENDIZAJE DE SEGURIDAD ALIMENTARIA BASADO EN PROYECTOS: UNA EXPERIENCIA EN EL EMPRENDIMIENTO AGROALIMENTARIO.

Juan-García A.1, Pallarés N.1, Berrada H.1\*, Matínez-Rubio D. 2, Ferrer E. 1, Moltó J.C. 1, Barba F.J. 1, Juan C. 1 1 Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Facultat de Farmàcia. Universitat de València, València, España \*(houda.berrada@uv.es) 2 Departamento de Psicología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Europea de Valencia, València, España

El programa internacional de innovación docente en emprendimiento universitario “UV Emprén Aprèn” dentro del Vicerrectorado de Empleo y Programas Formativos de la Universitat de València, ha financiado junto al Banco de Santander proyectos de innovación educativa en emprendimiento universitario para formar estudiantes comprometidos con el progreso y el espíritu emprendedor hacia economías más competitivas e innovadoras. MindInnFood and Feed es un proyecto que aúna el fomento y aprendizaje de estrategias de emprendimiento e innovación en el sector agroalimentario, con conocimientos en materia de seguridad alimentaria, tanto teóricos como legislativos.

El proyecto se ha desarrollado en el periodo académico 2022-2023 en un curso con sesiones sobre mindful-eating, upcycling, seguridad alimentaria y nuevas tecnologías. Dentro de un espacio multidisciplinar y colaborativo, los estudiantes de grado, máster y doctorado de áreas de ciencias de la salud y de la alimentación, pudieron aprender conceptos de emprendimiento, tecnologías innovadoras y seguridad alimentaria para elaborar un proyecto innovador agroalimentario. Además, participaron nueve empresas, tanto de alimentación humana como animal que, mostraron sus líneas de innovación en desarrollo, atendiendo a las necesidades y demandas del mercado.

Durante la sesión de seguridad alimentaria se contextualizó la importancia de hacer propuestas innovadoras no solo con calidad nutricional sino también que contemplasen la seguridad de los procesos y del producto final. Las ponencias sobre la huella toxicológica de los contaminantes en alimentos, así como el uso de métodos de predicción de toxicidad en seguridad alimentaria pusieron el foco en la importancia de realizar controles y disponer de metodología efectiva. Pasando después a señalar la importancia de los compuestos naturales bioactivos de los alimentos por tener una acción de protección y prevención frente a contaminantes. La sesión abordó también la propuesta de tecnologías en industria alimentaria como los pulsos eléctricos y los procesos de altas presiones, aplicados en la mitigación a contaminantes a la vez que se ha evaluado su efecto sobre los compuestos bioactivos.

**Agradecimientos:** Universitat de València. Programa internacional d'innovació docent en empenedoria universitària “UVEmprén Aprèn” i desenvolupar Projectes d'innovació educativa especialitzats en empenedoria universitària en el marc del CAMPUS UVEMPRÉN 2022.

### ED-C8) GAMIFICACIÓN: ESTRATEGIAS DE RETROALIMENTACIÓN DOCENTE EN LA ASIGNATURA DE TOXICOLOGIA FORENSE

Cascajosa-Lira A, Plata-Calzado C, Jos A\*, Cameán A. Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. (angelesjos@us.es)

En el proceso educativo es importante promover el uso de diversas metodologías, y una de ellas es la gamificación. Esta técnica implica llevar elementos de juego a contextos donde no son habituales, como, por ejemplo, en la educación universitaria. La retroalimentación es esencial para el éxito del aprendizaje. Al proporcionar a los estudiantes una retroalimentación clara y específica, pueden identificar sus fortalezas y debilidades, y trabajar para mejorar su rendimiento, así como motivar a los estudiantes, proporcionándoles información sobre

su progreso y logros. En este sentido, en la asignatura de Toxicología Forense del grado de Criminología se ha utilizado la herramienta Kahoot como método de gamificación. De esta forma, los estudiantes realizaban una autoevaluación competitiva al finalizar cada uno de los temas de la asignatura, con el fin de conocer sus debilidades para reforzarlas en la siguiente clase. El tema que más preguntas correctas tuvo fue el de “Intoxicación por plaguicidas” con un 65,31% de aciertos. Por el contrario, el tema que más preguntas incorrectas tuvo fue el de “Intoxicación por medicamentos”, con un 18,33% de aciertos. Ésto nos permitió conocer a los profesores las principales debilidades de los alumnos y llevar a cabo un refuerzo positivo para evitar el fracaso en la evaluación. En conclusión, según los resultados obtenidos, se puede afirmar que la gamificación es una herramienta motivadora que estimula la exploración y puede resultar muy útil para mejorar la adquisición de conceptos y consolidar los conocimientos ya obtenidos en una asignatura. Por lo tanto, podría ser utilizada eficazmente como una herramienta de evaluación en clases teóricas.

**Agradecimientos:** Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar del contrato FPU (FPU2019-01247). Cristina Plata Calzado agradece a la Junta de Andalucía por la concesión del contrato predoctoral (PREDOC\_00447).

**Palabras clave:** Gamificación, Innovación Docente, Aprendizaje, Teoría, Toxicología.

### ED-C9) IDENTIFICACIÓN Y REFLEXIÓN SOBRE LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS) EN LA ASIGNATURA BIOÉTICA Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DEL GRADO EN BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.

Oropesa AL\*, Míguez MP, Soler F, Martínez MS, Pérez-López M Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres (España) \*aoropesa@unex.es

La Organización de Naciones Unidas aprobó en 2015 la Agenda 2030 sobre Desarrollo Sostenible en la que se establecen 17 Objetivos. Las Universidades poseen un papel fundamental para contribuir a que la sociedad alcance dichos desafíos a través de los procedimientos de aprendizaje, enseñanza e investigación, de ahí la importancia de integrar la educación en objetivos de desarrollo sostenible en las instituciones de educación superior. Tal implementación contribuirá a que los estudiantes adquieran habilidades, conocimientos y mentalidad para abordar los desafíos de desarrollo sostenible a los que se enfrentarán en su vida personal y profesional. Partiendo del hecho de que en el programa docente de la asignatura “Bioética y Experimentación Animal” (Grado en Bioquímica, UEx) se abordan un importante número de objetivos de desarrollo sostenible, se ha planteado una actividad destinada a que los estudiantes identifiquen y reflexionen de una forma crítica sobre los ODS y metas relacionadas con cada uno de los temas contemplados en el programa. Los estudiantes integrantes de cada grupo han desarrollado un trabajo colaborativo y plasmado sus reflexiones en un documento modelo. El análisis de estos documentos ha revelado que en la citada asignatura se tratan todos los ODS (1-17), con mayor frecuencia los ODS 3 (Salud y bienestar) > 9 (Industria, innovación e infraestructura) > 4 (Educación de calidad) = 15 (Vida de ecosistemas terrestres) = 16 (Paz, justicia e instituciones sólidas). Con esta actividad, el estudiante ha desarrollado diferentes competencias: básicas (3 y 4), transversales (1 y 7) y específica (12) contempladas en el Verifica del Grado. Dicha actividad ha sido evaluable en el contexto de la calificación final de la asignatura.

**Palabras clave:** Bioética; Docencia; Metas; Objetivos de desarrollo sostenible (ODS); Universidad.

### ED-C10) ACTIVIDADES DE LA RED IBEROAMERICANA DE TOXICOLOGÍA Y SEGURIDAD QUÍMICA

E. de la Peña I O.Herrero 2

1) RITSQ España (ritsq.toxicologia@gmail.com) 2) RITSQ-UNED España (oscar.herrero@ccia.uned.es)

En el cartel mostramos la estrecha colaboración entre la Organización

Hispana de Toxicólogos (HOT) de la Sociedad de Toxicología americana (SOT). Esta red creada por iniciativa conjunta de la Universidad de São Paulo, miembro del IUTOX y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Asociación Española de Toxicología (AETOX), sus actividades las iniciamos en 2006 y desde entonces hemos celebrado tres reuniones de la RITSQ, en Montreal, Canadá 2007; en Barcelona España 2010, y en Mérida, México 2016. El RITSQ forma parte de las organizaciones hermanas de la Organización Superior de Toxicólogos de la Sociedad de Toxicología (HOT-SOT). En los dieciséis años de existencia de la mencionada RITSQ, utilizando la web se mostraron presentando: noticias, congresos, cursos, noticias de la RITSQ; y hasta la fecha se han presentado 136 carteles, en congresos, seminarios y jornadas. En la página web se publican por año los datos de los carteles presentados en congresos. El RITSQ tiene como objetivo publicar la información que nos faciliten sobre los nuevos congresos y cursos de interés toxicológico y seguridad química, por lo que publicamos dicha información en la citada página web. Se muestran los datos publicados sobre 1 noticia, 2 congresos, 8 cursos, 1 informe de la red RITSQ, 4 carteles, 76.738 usuarios, 111.639 sesiones y 222.633 del número de visitas a páginas. Los datos muestran que se ha producido un sensible aumento del número de usuarios, sesiones y número de páginas visitadas; por todo esto solicitamos a los posibles organizadores de eventos que tengan la amabilidad de brindarnos la información relevante para publicarla en nuestra página web (<http://ritsq.org>).

**Palabras clave / Keywords:** Usuarios, sesiones, páginas visitadas, toxicología, seguridad / users, session, page visited, toxicology, safety

#### EX-C1) ESTUDIO *IN VIVO* DEL PERFIL TOXICOCINÉTICO DEL PROPIL-PROPANO TIOSULFONATO.

Cascajosa-Lira A1, Pichardo S1\*, Baños A2, de la Torre JM2, Jos A1, Cameán AM1

*IÁrea de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. 2DMC Research Center, Granada, España. (spichardo@us.es)*

El propil-propano tiosulfonato (PTSO) es un compuesto organosulfurado que se encuentra en las especies de *Allium* spp. Este compuesto resulta de interés para la industria agroalimentaria debido a su potencial uso como aditivo sensorial de piensos. El objetivo del siguiente estudio fue llevar a cabo un ensayo toxicocinético *in vivo* en ratas Sprague Dawley a una dosis de 175 mg/kg. Posteriormente, se tomaron muestras de plasma a diferentes tiempos (10 min, 20 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h y 24h) y se analizaron las concentraciones de PTSO y/o sus metabolitos por UHPLC-MS/MS. Los resultados revelaron que no se detectó PTSO en plasma a ninguno de los tiempos ensayados; sin embargo, sí que se identificaron metabolitos de fase I y fase II. Sin embargo, hubo un gran aumento en el número de metabolitos en plasma a partir de los 20 min. La mayoría de los metabolitos encontrados fueron de fase II, principalmente conjugados con aminoácidos, seguidos de acetilación, conjugación con glutatión, con palmitoilo, o con sulfato. Por el contrario, en fase I encontramos metabolitos que surgen como consecuencia de reacciones de desaturación, nitrorreducción y el cambio de tiourea a urea. Es recomendable llevar a cabo estudios empleando otras técnicas como GC-MS/MS que confirmen la posible presencia del PTSO en plasma, así como la de aquellos metabolitos volátiles característicos de los compuestos organosulfurados.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Junta de Andalucía por la financiación del proyecto (P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**Palabras clave:** Feed additive, ADME, metabolism, *in vivo*, toxicokinetic, PTSO.

#### EX-C2) EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE PTSO EN LA

#### PALATABILIDAD Y LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN CONEJOS

Cascajosa-Lira A1, Pichardo S1, Ricci A2, Aguinaga-Casañas M.A2 Baños A2, Barausse A3, Frabetti A3, Jos A1, Cameán A1\*.

*1 Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. 2 DMC Research Center, Granada, España. 3 Gruppo Martini, Forlì-Cesena, Italia. (camean@us.es)*

El propil-propano-tiosulfonato (PTSO) es un compuesto organosulfurado presente en *Allium* spp. Este compuesto se ha propuesto para diferentes aplicaciones en el sector agroalimentario, principalmente como aditivo para piensos. Sin embargo, es necesario demostrar su efectividad como promotor del crecimiento en especies de interés ganadero, así como su aceptabilidad por parte de los animales. Con este propósito, se realizó un estudio en dos granjas de conejos (Gruppo Martini, Italia) con una capacidad de 5500-6000 conejos por lote. Durante 46 días, se monitorizaron los parámetros productivos de cuatro lotes en cada granja. Los conejos fueron destetados a los 38 días y alojados en jaulas horizontales, donde se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* hasta el sacrificio a los 76 días. Los lotes fueron asignados aleatoriamente a una dieta basal de un pienso peletizado del grupo control o una dieta similar con la adición de 1g/kg de GARLICON (DOMCA, España), producto que contiene un 30% de PTSO. Los resultados no mostraron diferencias en el peso y número de gazapos al inicio del ensayo entre los lotes. Tras el tratamiento, se observó un mayor peso final por conejo y peso total de los lotes que consumieron pienso enriquecido con PTSO. El uso de este compuesto a una dosis de 30 ppm mejoró la palatabilidad de los piensos en los conejos reflejándose en una mayor ingesta de los mismos. El aumento en el consumo medio diario influyó directamente en la ganancia media diaria y en el peso final de los animales, además de favorecer un mayor retorno de carne en el matadero. En conclusión, el uso de PTSO como aditivo de piensos contribuye a mejorar la palatabilidad y el rendimiento de las explotaciones cunícolas.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la junta de Andalucía por la financiación del proyecto (P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**Palabras clave:** aditivo de piensos, PTSO, conejo, producción ganadera.

#### EX-C3) EFECTOS DEL PROPILPROPANO TIOSULFONATO SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y EL SISTEMA ENDOCRINO EN RATONES CD1

Cascajosa-Lira A1, Guzmán-Guillén R1, Pichardo S1\*, Molina AM2, Ayala N2, Moyano R2, Baños A3, de la Torre JM3, Jos A1, Cameán AM1.

*IÁrea de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. 2Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin, 14071 Córdoba, España. 3DMC Research Center, Granada, España. (spichardo@us.es)*

El género *Allium* es conocido por contener compuestos naturales como los organosulfurados (OSC). En particular, el propil propanotiosulfonato (PTSO) de la cebolla ha demostrado efectos bioestimulantes en agricultura. Esto lo convierte en una potencial herramienta para la prevención y control de enfermedades y plagas. En este estudio se investigaron por primera vez los posibles efectos tóxicos del PTSO sobre la reproducción y los niveles hormonales en ratones CD1. Los ratones fueron expuestos a tres dosis de PTSO (0, 14, 28 y 55 mg/kg p.c./día) durante 11 semanas en machos o 16 semanas en hembras. Se realizaron análisis de los niveles de hormonas en suero mediante ELISA, y un análisis de la expresión de genes relacionados con la reproducción mediante qT-PCR. Los niveles de hormonas de estradiol, testosterona, LH y FSH se mantuvieron en niveles normales, sólo la progesterona mostró niveles más altos en algunos lotes de machos, no pudiéndose establecer una relación clara y dependiente con

la dosis de PTSO. Por último, los resultados no mostraron alteraciones en la expresión génica de ninguno de los genes analizados en los testículos de los ratones macho a ninguna de las dosis ensayadas. En conclusión, estos resultados confirman el perfil de seguridad del PTSO para algunas aplicaciones agroalimentarias en las condiciones ensayadas. Sin embargo, se necesitan más estudios para una completa evaluación de riesgo del PTSO que corrobore su seguridad.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Junta de Andalucía por la financiación del proyecto (P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**Palabras clave:** aditivo alimentario, toxicología reproductiva, ratón CD1, PTSO.

#### EX-C4) ENSAYO DE TOXICIDAD *IN VIVO* SOBRE DOS GENERACIONES (OECD 416) DEL PROPIL-PROPANO TIOSULFONATO

Cascajosa-Lira A1, Guzmán-Guillén R1, Pichardo S\*1, Ortiz-Jaraba I2, Ayala N3, Moyano R3, Baños A4, de la Torre JM4, Jos A1, Cameán AM1.

*IÁrea de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. 2 Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España 3 Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin, 14071 Córdoba, España. 4 DMC Research Center, Granada, España. (spichardo@us.es)*

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos sobre dos generaciones del compuesto organosulfurado PTSO siguiendo la guía de la OECD nº 416. Para ello, el compuesto se administró en el alimento a ratones CD-1, para estudiar la posible toxicidad sistémica en los progenitores y en la descendencia y/o alteraciones en la fertilidad o el embarazo. También se evaluó la afectación en el crecimiento y desarrollo de la descendencia a lo largo de dos generaciones expuestas a 3 niveles de dosis (14, 28 y 55 mg/kg de peso corporal/día). Por último, se pudo identificar los principales órganos diana y los efectos del PTSO en ratones en un estudio de toxicidad reproductiva multigeneracional. El ensayo demostró incrementos significativos en los pesos de los animales machos tratados con 14 mg/kg de peso corporal día; sin embargo, en las hembras no hubo un cambio significativo en el peso ni durante el periodo previo al apareamiento, en la gestación, o en la lactancia. Tras la necropsia no se identificaron cambios significativos en los pesos de los diferentes órganos estudiados. No hubo diferencias significativas en los ciclos estrales de las hembras en ninguno de los niveles de dosis ensayados. Este ensayo multigeneracional llevado a cabo por primera vez con PTSO nos proporciona una visión de su seguridad a largo plazo, no identificándose efectos hereditarios ni tardíos. La información obtenida a través de este ensayo es crucial para la autorización y regulación de sustancias utilizadas como aditivos alimentarios.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la Junta de Andalucía por la financiación del proyecto (P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**Palabras clave:** aditivo alimentario, OCDE 416, Toxicidad en dos generaciones, ratón CD1, PTSO.

#### MA-C1) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y PREDICCIÓN DEL ADME *IN SILICO* DEL PROPIL-PROPANOTIOSULFINATO Y SUS PRINCIPALES METABOLITOS

Cascajosa-Lira A1, Pichardo S1\*, Baños A2, de la Torre JM2, Jos A1, Cameán A1.

*IÁrea de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España. 2 DMC Research Center, Granada, España. (spichardo@us.es)*

El propil-propano-tiosulfonato (PTSO) es un compuesto organosulfurado presente en *Allium* spp. Este compuesto tiene potenciales aplicaciones en el sector agroalimentario, como aditivo sensorial para piensos. Sin embargo, su uso con fines comerciales depende de la evaluación de su toxicidad. El presente trabajo tiene por objeto realizar un estudio piloto del perfil toxicocinético y toxicodinámico del PTSO combinando diferentes técnicas *in silico* con el fin de predecir su ADME y sus mecanismos de toxicidad. También se realizaron estudios de ecotoxicidad *in silico* considerando la importancia del impacto ambiental del compuesto antes de su uso comercial. En cuanto al proceso de absorción, el PTSO presenta una predicción *in silico* del 0,005% de probabilidad de ser absorbido. Además, cabe esperar que tanto el PTSO como sus metabolitos tengan una unión a glicoproteínas limitada y permanezcan en su forma libre disponibles para atravesar las barreras biológicas. En cuanto a su eliminación, tanto PTSO como sus metabolitos muestran un aclaramiento similar: 9,40 ± 2,52 mL/min / kg y vida media similar: 0,75 ± 0,13 h. Los valores de toxicidad aguda en rata, mutagenicidad en el test de Ames, carcinogenicidad o toxicidad respiratoria tienen un valor por debajo del 50% tanto para PTSO como sus metabolitos, especialmente los metabolitos de fase II: conjugados con glutatión y con cisteína. Los resultados del estudio *in silico* de ecotoxicidad evidenciaron que el metabolismo indujo la formación de metabolitos de menor actividad que el compuesto original, excepto dimercaprol y 3-mercaptopropano1,2- diol.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a la junta de Andalucía por la financiación del proyecto (P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**Palabras clave:** aditivo alimentario, ADME, predicción de la toxicidad, *in silico*, toxicocinética, PTSO.

#### MA-C2) Establecimiento de un modelo de esferoides de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) para estudios de citotoxicidad

Franco-Campos F, Martínez-Alonso C, Taroncher M, Rodríguez-Carrasco Y, Ruiz, M<sup>1</sup>.

*<sup>1</sup>Laboratorio de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universitat de València. Valencia, España. Felipe.Franco@uv.es*

El campo de la toxicología tuvo un avance significativo con la aplicación de los cultivos celulares en monocapa (2D), lo cual permitió evaluar los mecanismos de acción y efectos citotóxicos de una amplia gama de compuestos, incluidos los plaguicidas y las micotoxinas. Los modelos celulares contribuyeron a la aplicación de las 3R' en beneficio de la disminución del empleo de modelos de experimentación animal. Si bien estos modelos celulares siguen vigentes en la investigación biomédica general, se ha propuesto aumentar aún más su reproducibilidad, ya que la principal limitación que éstos presentan es la escasa interacción y comunicación entre los diferentes tipos de células de un mismo tejido/órgano requisito imprescindible para una correcta función celular. Una alternativa *in vitro* más representativa al modelo en monocapa son los cultivos en esferoides (3D) cuya morfología y fisiología es diferente al modelo 2D e imita en mayor escala el ambiente celular *in vivo* permitiendo una mayor interacción entre células y la matriz extracelular. Dentro de las líneas celulares existentes, la de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) permite un amplio abanico de ensayos de toxicidad básica y de neurotoxicidad por tener fenotipos epitelial y neuronal, los cuales pueden aplicarse de forma combinada o aislada dependiendo del estudio que se quiera realizar. El objetivo de este trabajo fue la optimización de un protocolo para la obtención de esferoides de células SH-SY5Y. Los resultados obtenidos demostraron que la optimización de los esferoides se alcanza a los 7 días con un área aproximada de 300 µ<sup>3</sup>, un diámetro de 550 µm y un peso de 80000 ng. Con este modelo optimizado, se espera que la evaluación de la citotoxicidad de micotoxinas y plaguicidas en esferoides (3D) en lugar de en cultivos en monocapa (2D) refleje con mayor precisión el comportamiento celular *in vivo*.

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-

115871RB-I00). F. Franco Campos agradece a la Generalitat Valenciana por la beca pre-doctoral “Santiago Grisolia” (CIGRIS/2021/073), CPI-22-260. C. Martínez Alonso agradece a la F.P.U. Beca (FPU21/04950) otorgada por el Ministerio de Universidades y M. Taroncher agradece a la beca F.P.I. (PRE2021-096941) otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

**Palabras Claves:** Células SH-SY5Y, Esferoides, Cultivos celulares, Fenotipo celular.

#### **MA-C3) MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL TOLUENO SOBRE LAS NEURONAS COLINÉRGICAS SN56 A TRAVÉS DE LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTAMATO.**

Inés Lobo, Ana María Manzano, Andrea Flores, Paula Moyano, Margarita Lobo, María Teres Frejo, Javier Del Pino.

El TL (TL) es un disolvente universal ampliamente utilizado en la industria del pegamento y ocasionalmente consumido como sustancia de abuso por su efecto neuroestimulante. Su versatilidad y su bajo precio lo convierten en un compuesto al que la población está altamente expuesta. Entre los efectos tóxicos descritos para el TL se encuentra la inducción de alteraciones cognitivas, como las observadas en la Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Sin embargo, los mecanismos que dan lugar a dichas alteraciones no son completamente conocidos. Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (PB) regulan los procesos de aprendizaje y memoria y su neurodegeneración conduce a la inducción de alteraciones cognitivas. La transmisión glutamatérgica también se ha relacionado con la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria y su alteración con la inducción de alteraciones cognitivas y neurodegeneración. Se ha descrito el PB es una de las regiones entre las que se acumula el TL. Además, el TL puede generar estrés oxidativo y alterar la transmisión glutamatérgica, que a su vez pueden desencadenar neurodegeneración. Por lo tanto, hipotetizamos que el TL induce la neurodegeneración de las neuronas colinérgicas del PB a través de la alteración de la transmisión glutamatérgica y la generación de estrés oxidativo. Para probar nuestra hipótesis determinamos, sobre las neuronas colinérgicas SN56 procedentes del PB, la alteración de la transmisión glutamatérgica, la producción de H2O2 y malondialdehído (MDA) como marcadores de estrés oxidativo y la implicación de estos mecanismos en la inducción de la muerte neuronal. Nuestros resultados demuestran que el TL induce muerte neuronal de las neuronas colinérgicas del PB por apoptosis, en parte, a través de la generación de estrés oxidativo y la alteración de la transmisión glutamatérgica. Nuestros resultados son relevantes dado que aportan nueva información sobre la neurotoxicidad del TL; pueden ayudar a comprender los mecanismos que conducen a las alteraciones cognitivas inducidas por el TL y a su tratamiento.

**Palabras clave:** TL, toxicidad, prosencéfalo basal, estrés oxidativo, glutamato.

#### **MA-C4) INSULIN SIGNALING DISRUPTION AND INF- $\gamma$ UPREGULATION INDUCE AB1-42 AND HYPERPHOSPHORYLATED-TAU PROTEINS SYNTHESIS AND CELL DEATH AFTER PARAQUAT TREATMENT OF PRIMARY HIPPOCAMPAL CELLS.**

Paula Moyano, Andrea Flores, Inés Lobo, María Luisa Abascal, Javier Sanjuan, Jimena García, Emma Sola, José Manuel García, Margarita Lobo, María Teres Frejo, Javier Del Pino.

Acute and long-term paraquat (PQ) exposure produces hippocampal neurodegeneration and cognition decline. Although some mechanisms involved in these effects were found, the rest are unknown. PQ treatment, for 1 and 14 days, upregulated interferon-gamma signaling, which reduced insulin levels and downregulated the insulin pathway through phosphorylated-c-Jun N-terminal-kinase upregulation, increasing glucose levels and the production of A $\beta$ 1-42 and phosphorylated-tau, by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) overexpression and phosphorylated-GSK3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ; ser9) level reduction, respectively, which induced primary

hippocampal neuronal loss. This novel information on the PQ mechanisms leading to hippocampal neurodegeneration could help reveal the PQ actions that lead to cognition dysfunction.

**Keywords:** Paraquat, hippocampus, INF- $\gamma$ , insulin, cell death

#### **MA-C5) Single and repeated bisphenol A treatment induces ROS, A $\beta$ and hyperphosphorylated-tau accumulation, and insulin pathways disruption, through HDAC2 and PTP1B overexpression, leading to SN56 cholinergic apoptotic cell death**

Andrea Flores a\*, Paula Moyano a\*, Emma Sola a\*, José Manuel García a, Jimena García a, María José Anadón b, María Teresa Frejo a, María Victoria Naval d, María de la Cabeza Fernández c, Inés Lobo\*<sup>a</sup> Javier del Pino\*<sup>a</sup>,

a *Department of Pharmacology and Toxicology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain*

b *Department of Legal Medicine, Psychiatry and Pathology, Medicine School, Complutense University of Madrid, 28041, Madrid, Spain*

c *Department of Chemistry in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy School, Complutense University of Madrid, 28041, Madrid, Spain*

d *Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Pharmacy School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain*

Bisphenol-A (BPA), a polymer component extensively used, produces memory and learning alterations after acute and long-term exposure. However, the mechanisms are not well known. Cortex and hippocampus neuronal networks control cognitive functions, which are innervated by basal forebrain cholinergic neurons (BFCN), and their neurodegeneration induces cognitive dysfunctions. Wild type or protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), histone deacetylase 2 (HDAC2), tau or  $\beta$  amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) silenced SN56 cells treated with BPA (0.001  $\mu$ M–100  $\mu$ M) with or without N-acetylcysteine (NAC; 1 mM), following 1 and 14 days, were used, as a model of BFCN to determine the insulin pathway dysfunction, oxidative stress (OS) generation and amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) and tau proteins accumulation involvement in the BFCN cell death induction, as a possible mechanism that could produce the cognitive disorders reported. BPA-induced BFCN cell death, after 24 h and 14 days of treatment, through insulin pathway dysfunction, OS generation, mediated by NRF2 pathway downregulation, and A $\beta$  and tau proteins accumulation, which were in turn induced by HDAC2 and PTP1B overexpression. This is relevant information to explain the BFCN neurodegeneration mechanisms that could trigger the neurodegeneration in the rest of the regions innervated by them, leading to cognitive disorders

**Keywords:** Bisphenol-A, SN56 cholinergic neuronal cell death, PTP1B, HDAC2, Insulin

#### **TF-C1) DETERMINACIÓN DE TRAMADOL Y SU PRINCIPAL METABOLITO EN LÍQUIDO PERICÁRDICO MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA Y CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Laura Blanco García, Ana María Bermejo Barrera, Iván Álvarez Freire, Pamela Cabarcos Fernández y María Jesús Tabernero Duque.

*Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.*

El tramadol es un medicamento opioide que se utiliza para tratar el dolor leve y moderado. Posee un doble mecanismo de acción, siendo un agonista puro y no selectivo de los receptores opioides, especialmente del  $\mu$ , y a su vez, inhibiendo la recaptación de neurotransmisores. Además, su principal metabolito, el O-desmetiltramadol, es activo por lo que también contribuye a sus efectos mediante los mismos mecanismos.

El uso de este fármaco adquirió relevancia debido a su menor potencial de abuso frente otros opioides. Además, también presenta menor tasa de depresión respiratoria como efecto secundario. Debido a la creencia de ser más seguro, se ha extendido su uso, pero también su mal uso y

abuso. Por ello, han aumentado los casos de intoxicaciones relacionadas con el tramadol, especialmente en combinación con otras sustancias depresoras del sistema nervioso central.

En este contexto se desarrolló un método para su determinación en líquido pericárdico. Este constituye un ultrafiltrado del plasma sanguíneo, guardando una buena correlación con su contenido. Por ello, se postula como una alternativa a la sangre cuando ésta no se puede obtener o cuando la concentración de tóxicos se ve alterada. Se utilizó la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) con acetona como dispersante y cloroformo como extractante. La determinación del tramadol y su metabolito se llevó a cabo mediante GC-MS y la validación del método se llevó a cabo siguiendo la guía de validación de la FDA.

Los resultados obtenidos demostraron la linealidad en el rango de 0,05 a 5 µg/mL para el tramadol y de 0,3 a 5 µg/mL para el O-desmetiltramadol. El límite de detección (LOD) alcanzado para el tramadol fue de 0,02 µg/mL mientras que para el metabolito fue de 0,1 µg/mL. Además, se obtuvieron resultados satisfactorios en el resto de parámetros estudiados de selectividad, exactitud, precisión y recuperación.

**Palabras clave:** Tramadol, O-desmetiltramadol, líquido pericárdico, DLLME, GC-MS.

### TF-C2) DIFICULTADES ANALÍTICAS E INTERPRETATIVAS DERIVADAS DEL USO DE EMULSIONES LIPÍDICAS EN EL RESCATE DE TÓXICOS. A PROPÓSITO DE UN CASO.

Del Fresno González, V.; Bravo Serrano, B.; Baeza Díez, I.; Bueno de Bien, J.R.

*Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Madrid. Servicio de Química.*

Las emulsiones lipídicas intravenosas son cada vez más utilizadas en el tratamiento de intoxicaciones agudas causadas por tóxicos lipófilos. Cuando estas terapias de rescate son administradas en el periodo perimortem, pueden permanecer en la sangre una vez ocurrido el óbito. En este trabajo se plantean las dificultades encontradas en el análisis químico-toxicológico, así como en la interpretación de los resultados obtenidos en un fallecimiento por una presunta intoxicación medicamentosa tratada con Lipoplus 20%®.

Se recibieron 8 tubos de sangre con distintos conservantes procedentes de la autopsia de una mujer de 47 años fallecida en un centro hospitalario, con antecedentes de trastorno psiquiátrico e intentos autolíticos previos. Durante su ingreso hospitalario sufrió un síncope con pausas de apnea. Se realizaron maniobras de RCP reglada sin éxito, que incluyeron la administración de una emulsión lipídica de rescate de tóxicos (Lipoplus 20%®). Ante la discordancia entre los resultados cuantitativos obtenidos de los diversos fármacos detectados (antidepresivos, antipsicóticos y benzodiazepinas) se analizaron todas las evidencias, obteniendo resultados muy dispares. Esto podría deberse a la mayor o menor presencia del lípido en el tubo de sangre, a los conservantes y anticoagulantes presentes en la muestra, así como también a la técnica analítica empleada para el análisis.

### TF-C3) CONSUMO DE SUSTANCIAS Y RIESGOS EN JÓVENES Y ADOLESCENTES

Leal Rodríguez Alba, González Muñoz María José\*\*, Mateos Vega Carmen José\*

*Unidad Docente de Toxicología, Dpto. Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá Crta. Madrid-Barcelona Km. 33.6. 28871, Alcalá de Henares. Madrid. \* Investigador principal \*\* Encargado presentación y contacto (mariajose.gonzalez@uah.es)*

En la actualidad, la prevalencia de consumo en adolescentes y jóvenes es un problema de salud pública importante. En la encuesta realizada en los meses de noviembre 2021 a enero 2022 a jóvenes y adolescentes entre 12 y 25 años se ha puesto de manifiesto que las drogas más consumidas son el alcohol, el tabaco y el cannabis, en ese orden, siendo mayor en hombres que en mujeres.

La facilidad de adquisición de estas sustancias y la influencia del

entorno social parecen ser dos factores de riesgo determinantes para el consumo, donde el entorno en el que se desarrolla este grupo de población juega un papel clave sobre la adicción. El 50% de los encuestados dijeron haberse sentido incitados a consumir. Las relaciones sociales establecidas en esta etapa parecen ser un factor predictivo del consumo, aunque el fracaso escolar y el entorno familiar también influyen de manera considerable. El consumo de drogas influye de manera negativa en la salud de estos jóvenes, quienes podrían encontrarse con un riesgo aumentado en el desarrollo de enfermedades físicas y mentales al alcanzar la vida adulta.

**Palabras clave:** Tolerancia, factor de riesgo, consumo, drogas, entorno social.

### TF-C4) ESTIMACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAFEÍNA EN LA LECHE MATERNA

Gallardo Moreno Irene, González Muñoz María José\*\*, Mateos Vega Carmen José\*

*Unidad Docente de Toxicología, Dpto. Ciencias Biomédicas, Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá Crta. Madrid-Barcelona Km. 33.6. 28871, Alcalá de Henares. Madrid. \* Investigador principal \*\* Encargado presentación y contacto (mariajose.gonzalez@uah.es)*

La cafeína es una metilxantina considerada por la OMS como una droga de abuso, debido a la dependencia, abstinencia e intoxicación que provoca. Se ha realizado un estudio transversal de tipo descriptivo durante los meses de abril a junio de 2022, a madres voluntarias (n=156) relacionado con la toma de cafeína durante la lactancia materna, haciendo comparativa de lo que se tomaba antes, durante y después del embarazo.

Previamente al embarazo, el 52% de estas mujeres tomaba cafeína, porcentaje que se redujo durante el embarazo al 35%. En el periodo de lactancia, el 41% de las madres retomaron el consumo de esta sustancia, debido a que no consideran la cafeína una droga. Este alcaloide es secretado en la leche materna a los 60 minutos después de la ingesta por parte de la madre, con una relación leche/plasma de 0,5/ 0,76. A estos niveles, debido a su prolongada vida media de eliminación en los recién nacidos por ausencia del CYP1A2, puede conllevar a una vasoconstricción e hipoxia fetoplacentaria con la afectación del crecimiento fetal. En el lactante, los efectos estimulantes de la cafeína se traducen periodos interrumpidos de somnolencia con mayor frecuencia e insomnio por lo que se recomienda un uso moderado. Se concluye que la cafeína sea una de las sustancias químicas psicoactivas de las que más hay que moderar su consumo durante la lactancia (menos de 300 mg/día) para evitar los posibles efectos que puede tener sobre el SNC del neonato.

**Palabras clave:** cafeína, lactancia, leche materna, efectos, consumo.

Forma de presentación: Poster

### TF-C5) PERFIL TOXICOLÓGICO DE CASOS DE SUICIDIO ANALIZADOS EN EL LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE DEL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Olga López-Guarnido<sup>1</sup>, Iván Álvarez-Freire<sup>2</sup>, Pamela Cabarcos-Fernández<sup>2</sup>, María Jesús Taberero-Duque<sup>2</sup>, Ana María Bermejo-Barrera<sup>2</sup>

*1 Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física. Facultad de Medicina. Avda de la Investigación 11, torre A, planta 4.18016. Granada (España). 2 Servicio de Toxicología Forense. Instituto de Ciencias Forenses. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. C/ San Francisco s/n 15782 .Santiago de Compostela (España)*

Según la OMS más de 700 000 personas mueren por suicidio cada año en todo el mundo, siendo la primera causa de muerte violenta en España. Los análisis estadísticos de las muertes por suicidio nos permiten identificar mejor los factores de riesgo para poder actuar sobre ellos.

El Objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los casos de suicidio recibidos para análisis en el laboratorio de Toxicología Forense del Instituto de Ciencias Forenses de la USC.

**Metodología:** Se han incluido los resultados toxicológicos en sangre de todos los casos de muerte por suicidio recibidos en nuestro laboratorio desde 2009 hasta 2022. Se analizaron 1341 casos. En el presente trabajo presentamos los resultados preliminares del estudio estadístico de estos datos.

**Resultados:** La gran mayoría (73,4 %, N=984) de los 1341 casos estudiados eran hombres y un 26,6 % mujeres (N= 357). La media de edad de la población fue 57 años. En cuanto al tipo de suicidio: el 62,5 % fueron por ahorcamiento (N=838), el 11,4% por intoxicación (N=153), el 11,1% precipitación (N=149), el 7,9% sumersión (N=106), el 3,7% por arma de fuego (N=50), el 2% por accidente de tráfico provocado intencionalmente (N=27), el 0,7% por arma blanca (N=10) y el 0,6% por quemadura (N=8). El tóxico más detectado fue el etanol (22,3%, N=299), seguido de las benzodiazepinas (19,2%, N=258) y antidepresivos (13,1%, N=176). La benzodiazepina más detectada fue el nordiazepan (N=116) y el antidepresivo más frecuente la venlafaxina (N=56). La proporción de hombres con resultado positivo en etanol es significativamente mayor que la de mujeres. En cambio, la proporción de mujeres con resultado positivo en antidepresivos, benzodiazepinas, analgésicos (opioides y no opioides) e hipnóticos es significativamente superior a los hombres.

#### TF-C6) DETERMINACIÓN DEL ZOLPIDEM EN SANGRE POR HPLC-PDA

María Elena Jaureguizar Rodríguez, Pamela Cabarcos Fernández, Iván Álvarez Freire, María Jesús Tabernero Duque, Ana María Bermejo Barrera, Inés Sánchez Sellero.

*Servicio de Toxicología Forense. Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" USC*

El zolpidem es un hipnótico no benzodiazepínico relativamente nuevo que se emplea para el tratamiento del insomnio a corto plazo, conocido como Z-drug. Se empezó a utilizar clínicamente en Europa en el año 1986 al tratarse de un fármaco que provoca un menor síndrome de abstinencia y dependencia en los pacientes, en comparación con las benzodiazepinas, y que produce una mejora general del sueño. Este medicamento es una imidazopiridina y un agonista del GABA<sub>A</sub>, el principal neurotransmisor del sistema nervioso central. Sus acciones son debidas a sus efectos agonistas en el sitio receptor de benzodiazepinas en los receptores GABA<sub>A</sub>.

El objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto de una nueva metodología analítica que permita la determinación y cuantificación del Zolpidem en muestras de plasma sanguíneo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos en serie (HPLC-PDA), empleando el Cloranfenicol como patrón interno.

La novedad del método radica en el uso de una técnica de extracción miniaturizada, Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), ajustándose a los requisitos de la llamada química analítica verde. Tras la optimización de diferentes parámetros, se ha fijado como disolvente extractante el tetracloruro de carbono y como disolvente dispersante el acetonitrilo.

El método desarrollado se ha validado siguiendo las recomendaciones de la Food and Drug Administration (FDA), alcanzándose un límite de detección (LOD) de 0.05 µg/mL, un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 0.20 µg/mL y recuperaciones superiores al 90% para el analito de interés.

Finalmente, el método se ha aplicado a diferentes muestras de sangre recibidas en el Laboratorio de Toxicología Forense.

**Palabras clave:** zolpidem, HPLC-PDA, DLLME, plasma, FDA

#### CL-C1) CARACTERIZACIÓN DE LOS ERRORES DE MEDICACIÓN REPORTADOS A UN CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICO CHILENO (CITUC).

Fernández C.<sup>1</sup>, Silva L.<sup>1</sup>, C. Retamal.<sup>1</sup>, Medel P.<sup>1,2</sup>, Bettini M.<sup>1</sup>, Solari S.<sup>1,2,3</sup>, Ríos JC.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Información Toxicológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC); <sup>2</sup>Programa de

*Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile; <sup>3</sup>Departamento de Laboratorios Clínicos, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. (cafernandez2@uc.cl)*

**Introducción:** La seguridad del paciente es fundamental para prestar servicios sanitarios esenciales de calidad. Los errores de medicación (EM) figuran entre las principales causas de daños prevenibles en la atención de salud a nivel global. Según la OMS, se estima que en USA los EM provocan daños en aproximadamente 1,3 millones de personas al año.

**Objetivo:** Caracterizar los EM recibidos por CITUC durante el periodo 2018-2022.

**Método:** Se realizó un estudio transversal con las llamadas recibidas en el periodo 2018-2022. Se analizaron solo los casos vinculados a EM.

**Resultados:** Se registraron 11.530 EM en el periodo de estudio, que constituyeron un 7,3% del total de llamados recibidos. El tipo de EM con mayor incidencia fue la "administración de un medicamento erróneo" (36,4%), siendo en la población adulta en la que ocurrieron más frecuentemente (29,6%). Luego se encuentra "administración de una dosis incorrecta" (25,3%), y a diferencia del tipo de EM anterior, en esta categoría la población con mayor número de casos fueron los lactantes y pre-escolares (24,4% y 25%, respectivamente). El 92,4% de los EM ocurrieron en el hogar y en un 29,7% con medicamentos que actúan sobre el Sistema Nervioso. Un 40,4% de los pacientes, presentaron sintomatología posterior al error. Los tres agentes con mayor incidencia fueron tramadol, paracetamol y clorfenamina.

**Conclusión:** Los EM más frecuentemente reportados corresponden a aquellos que ocurren en el hogar, siendo "administración de un medicamento erróneo" o "administración de una dosis incorrecta" los más frecuentes, y podrían llegar a tener consecuencias graves, independiente de su lugar de ocurrencia, considerando además que el tramadol es el agente con mayor incidencia, por lo que es fundamental implementar medidas de prevención no solo en el ámbito hospitalario, sino también ejecutar estrategias que eviten los EM en casa.

**Palabras clave:** Seguridad, Errores de medicación, Centros Toxicológicos, Medicamentos, Farmacovigilancia.

Autor principal Camila Fernández

#### CL-C2) EFFECT OF SILICIC ACID AND BEER CONSUMPTION ON THE ACCUMULATION OF CHROMIUM AND VANADIUM IN THE BRAINS OF MICE CHRONICALLY EXPOSED TO ALUMINIUM NITRATE.

Peña-Fernández A<sup>1</sup>, Evans MD<sup>1</sup>, Lobo-Bedmar MC<sup>2</sup>, Gonzalez-Muñoz MJ<sup>3</sup>

*IMIDRA. Finca el Encín, Crta. Madrid-Barcelona Km, 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Madrid-Barcelona Km, 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. <sup>1</sup>Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK; <sup>2</sup>Departamento de Investigación Agroambiental. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Crta.*

Our group has observed that silicon (Si), consumed in the form of silicic acid or through beer, significantly reduced the levels of copper, manganese and zinc in brain tissue in mice. The effect of aluminium (Al) and Si intake on the levels of chromium (Cr) and vanadium (V) was studied with six-week-old male NMRI mice. Animals were divided into four groups (n=12). A control group consisted of mice that received only deionised water. The other three groups received Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (100 µg/g), being higher in the Al group. Conversely, lower levels of Cr were detected in the faeces, urine and blood in the Al group, suggesting a potential effect of Al intoxication in the metabolism of Cr. These unknown effects might explain the lower levels of Cr that were also detected in the intoxicated animals' brain (0.346 µg/g). Thus, intoxicated animals that were provided with Si shown similar Cr-brain levels to non-intoxicated animals (0.360 and 0.352 vs. 0.395 µg/g). Consumption of beer and silicic acid appears to partially block the negative effects of aluminium ingestion in the normal metabolism of chromium. Further studies are needed to investigate the potential

interaction of Al in the absorption/excretion of V as this can also induce neurotoxicity. <sup>3</sup>), at a dose of 450 µg/ml dissolved in the drinking water, for three months. One group consisted of mice that received only aluminium nitrate (Al group); the other group (Al + silicic acid group) received aluminium nitrate and a solution of silicic acid (50 mg/ml); and the last group (Al + beer group) received aluminium nitrate and an amount of commercial beer equivalent to moderate to high consumption in humans (equivalent to 1 l/day). Elements were monitored in faeces, urine, blood and brain tissue with ICP-OES following previous methods. V was only detected in the faecal samples (LoD=0.01

**Keywords:** chromium, vanadium, aluminium intoxication, silicon, brain accumulation.

### TA-C1) HUMAN HEALTH RISKS TO ARSENIC FROM TOPSOILS ACROSS LEICESTERSHIRE, UK

Jagdev GS1, Evans MD1, Lobo-Bedmar MC2, Peña-Fernández A1  
*1Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK; 2Departamento de Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca el Encín, Crta. Madrid-Barcelona Km, 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.*

Significant areas of England have naturally elevated topsoil concentrations of total-arsenic (As), higher than the threshold established to identify contaminated soils (soil guidance value, SGV). We have performed a comprehensive monitoring study to determine the distribution of As in topsoils from urban public parks across Leicester and its rural surroundings. A total of 850 samples were collected (2017-18); 26 composite samples were appropriately prepared after mixing topsoil samples collected per location (18 urban, 8 rural), which were further processed in duplicate. As was measured twice in each of the 52 composite samples by ICP-MS after acid, microwave, digestion with nitric acid (69%)/chlorhydric acid (37%). As was found in all composites examined (LoD=0.395 mg/kg). Significantly higher levels were found in the rural areas [18.272 (14.026-20.381) vs. 14.369 (11.523-17.671); data presented as median and IQR, in mg/kg; Peto-Prentice test,  $\chi^2(1)=6.7$ , p-value=0.009], which might be attributed to geogenic sources as the enrichment factor for rural topsoils suggest minimal enrichment (EF=0.0735). Moreover, significant differences (p-value=4.0E-04) were found between the four ordinal directions dividing the urban region to study the distribution of As, showing the following distribution SW>NE>SE>NW, suggesting a wide distribution of this pollutant in Leicester that could be altered by anthropogenic sources as suggested by the EF range found (2.474-2.776). Total carcinogenic risks derived from oral, inhalation and dermal exposure to As from topsoils in the urban four ordinal directions (2.04E-05, 1.99E-05, 1.82E-05 and 1.36E-05), were within the range considered as acceptable for carcinogens (1.0E-06 to 1.0E-04). Moreover, the levels of total-As were lower than the established SGV (32 mg/kg) for residential land use by DEFRA-EA (Department for the Environment Food and Rural Affairs-Environment Agency). In general, the presence of inorganic As in Leicestershire would not represent a significant risk for the population, although other important sources including diet would need to be considered.

**Keywords:** arsenic, topsoils, presence and distribution, human risks, Leicestershire.

### TA-C2) BIOMONITORING CADMIUM CONTAMINATION IN URBAN AND RURAL SOILS ACROSS LEICESTERSHIRE (UK)

Jagdev GS1, Evans MD1, Lobo-Bedmar MC2, Sgamma T1, Peña-Fernández A1  
*1Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK; 2 IMIDRA. Finca "El Encín" A-2 Km, 38.2, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.*

A preliminary investigation of the presence of cadmium (Cd) in wild edible mushrooms species *Agaricus bitorquis* collected in Leicester (England), suggested some contamination by Cd in the inner city. To

determine the environmental presence/distribution/risks of Cd, 106 mushrooms were collected from Leicester city and Bradgate Park (a close rural park). Species identification was confirmed by DNA barcoding. Cd was monitored by ICP-MS in cleaned/dried/homogenised mushrooms mineralised with HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [LoD=0.081 µg/g dry weight (dw)]. Cd was also monitored in 850 topsoils collected across Leicestershire processed as composite samples (LoD=0.162 µg/g). Cd was found in all mushroom samples [median and range, in µg/g dw; 1.914 (0.081-13.446)], showing significant distribution across the four ordinal directions in which Leicestershire was divided (NW>NE>SW>SE; Peto-Prentice test,  $\chi^2(3)=22.4$ , p-value=2E-06). Content of Cd also showed species dependence (p-value=2E-14): *Agaricus bitorquis* > *Panaeolus foenicicium* > *Mycena citrinomarginata* > *Marasmius oreades* > *Coprinus atramentarius*. Levels of Cd in wild mushrooms found were within the range reported in similar studies carried out in Southern Spain and Northern Morocco. Slightly higher levels were found in topsoils collected in the urban area although without showing statistical significance (median and IQR, in µg/g; Peto-Prentice test,  $\chi^2(1)=2.9$ , p-value=0.09): 0.318 (0.270-0.516) vs. 0.305 (0.203-0.402), which might be attributed to different anthropic sources such as vehicles. All bioconcentration factor values were higher than one, suggesting that Cd is bioaccumulated by the mushrooms species collected in Leicestershire. The intake of Cd in the edible species of *A bitorquis* collected would not represent a carcinogenic risk for the population (risk quotient=5.14E-11). Similarly, total carcinogenic risks derived from oral, inhalation and dermal exposure to Cd from topsoils in the urban four ordinal directions (2.19E-07, 2.25E-07, 2.28E-07, 3.81E-07), were within the range considered as acceptable for carcinogens, suggesting a minimal risk for Leicester's population.

**Keywords:** cadmium, mushrooms, presence and distribution, human risks, Leicestershire.

### VE-C1) RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES EN MESOCARNÍVOROS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA.

Fernández-Casado, D., Pérez-López, M., Soler-Rodríguez, F.  
*Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres. (davikfc@gmail.com)*

Los rodenticidas anticoagulantes tienen un uso muy extendido en el control de plagas de roedores, pero no solo ellos se ven comprometidos por estos compuestos, sino que también se da la exposición en especies "no objetivo", cobrando una gran relevancia las intoxicaciones secundarias. Uno de los grupos biológicos que se ve más afectado por este tipo de intoxicación son los mesocarnívoros, tanto en la Península Ibérica como a nivel mundial. Esto es debido a factores tan variados como la dieta que poseen y los nuevos cambios que esta está experimentando (disminución de principales presas, convivencia con súperdepredadores, etc.), las adaptaciones a los nuevos medios que están colonizando (antropización del ecosistema, sistemas agroganaderos y núcleos urbanos) y su etología, cobrando gran importancia en este caso el carroñerismo (unido a la práctica de colocación de cebos ilegales). Los mesocarnívoros conforman el segundo grupo de animales más afectado por las intoxicaciones secundarias por rodenticidas anticoagulantes, únicamente precedido por las aves rapaces; sin embargo, se desconoce el impacto real de estos compuestos en sus poblaciones, creyéndose mucho mayor. Esto se debe, principalmente, a la notoria falta de estudios específicos sobre esta problemática en nuestro país (únicamente dos), en comparación a otros como Gran Bretaña o Francia, que aun sin ser numerosos, sobrepasan con creces los propios. A los pocos estudios de impacto poblacional se suma la falta de artículos de investigación sobre los síntomas y problemas que acarrear las exposiciones subletales a estos tóxicos, que pueden llevar a la muerte del depredador sin ser la causa principal de ella. Se requiere por tanto un análisis y estudio más exhaustivo de las implicaciones reales de los rodenticidas anticoagulantes en los mesocarnívoros peninsulares, los procedimientos de minimización de riesgos en cuanto a su uso y nuevas alternativas para el control de plagas.

**Palabras clave:** Rodenticida, anticoagulante, mesocarnívoro, roedor, intoxicación secundaria

### VE-C2) CASUÍSTICA DE LAS INTOXICACIONES DE FAUNA EN EXTREMADURA: PERÍODO 2002 A 2018.

Ibáñez-Pernía, Y. <sup>(1)</sup>; Galán-Carrillo, M. <sup>(2)</sup>; Hernández-Moreno D. <sup>(3)</sup>; Míguez, M.P. <sup>(1)</sup>; Martínez-Morcillo, S. <sup>(1)</sup>; Pérez-López M. <sup>(1)</sup>; Soler-Rodríguez F. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres <sup>(2)</sup> Centro de Recuperación "Los Hornos". Junta de Extremadura, Cáceres. <sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Madrid. (solertox@unex.es)

Las intoxicaciones en fauna silvestre son una realidad a nivel internacional. La región de Extremadura (España) goza de una importante riqueza faunística y de hábitats que es única a nivel europeo. En este trabajo se describe la metodología de trabajo llevada a cabo para el estudio de casos de intoxicaciones en el medio natural, las sustancias implicadas y las especies afectadas por los mismos durante los años 2002 a 2018. En este periodo se recibieron en nuestro Servicio de Diagnóstico Toxicológico un total de 779 casos sospechosos de intoxicación, que incluían 955 individuos de 59 especies animales diferentes. En 424 casos (54,43% del total) se confirmó la intoxicación como causa de la muerte del animal. Individuos de 35 especies diferentes se vieron implicados, siendo las más afectadas el buitre leonado (*Gyps fulvus*), perro doméstico (*Canis familiaris*), milano real (*Milvus milvus*) y buitre negro (*Aegypius monachus*) (suponiendo el 16,98%, 15,80%, 13,68% y 9,20% de los casos positivos, respectivamente). De entre las más de 38 sustancias tóxicas que fueron identificadas, el predominio de los plaguicidas anticolinesterásicos (carbamatos y organofosforados) fue claro al aparecer en más del 89% de los casos, predominando de manera individual y con amplia diferencia el carbofurano y el aldicarb, seguido del clorfenvinfós. A pesar de que los compuestos organofosforados aparecieron en un menor número de casos, sin embargo, presentaron una mayor variedad con 15 compuestos diferentes frente a los 8 carbamatos identificados. Otros compuestos del grupo de los antifúngicos, las benzodiazepinas, los barbitúricos, los piretroides y estricnina fueron también detectados.

**Palabras clave:** Plaguicidas; Intoxicación; Aves rapaces; Fauna silvestre

### VE-C3) DETECCIÓN DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES) Y ANTIMICROBIANOS EN MUESTRAS DE BUITRE LEONADO (*GYPF FULVUS*) DE ANDALUCÍA ENTRE LOS AÑOS 2012 Y 2022

Isabel Fernández-Verón<sup>(1)(2)</sup>, Irene Zorrilla-Delgado<sup>(1)</sup>, Nahúm Ayala-Soldado<sup>(2)</sup>, Antonio Jesús Lora-Benítez<sup>(2)</sup>, Ana M<sup>a</sup> Molina-López<sup>(2)</sup>, Rafael Mora-Medina<sup>(2)</sup> y M<sup>a</sup> del Rosario Moyano-Salvago<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Centro de Análisis y Diagnóstico de la Fauna Silvestre (CAD). Agencia de Medio Ambiente y Agua de Andalucía. Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul. Avda. Lope de Vega 9, 29010 Málaga <sup>(2)</sup> Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología, Unidad de Investigación Competitiva Zoonosis y Enfermedades Emergentes desde la Perspectiva de Una Salud (ENZOEM), Facultad de Veterinaria, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, Edificio Darwin, 14071, Córdoba, España

Es sabido que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los antimicrobianos son altamente tóxicos para las aves, provocando en algunos casos lesiones severas que pueden causar la muerte. Estos fármacos se usan habitualmente en medicina veterinaria, pudiendo quedar como residuos en las carroñas y llegar hasta las aves necrófagas. El buitre leonado (*Gyps fulvus*) es la especie de buitre más abundante en Andalucía, siendo la tercera región de España con un mayor número de ejemplares. El presente trabajo se basa en la vigilancia pasiva que se llevó a cabo sobre esta especie, concretamente en ejemplares procedentes de las provincias de Huelva, Córdoba y Málaga, recibidos en el Centro de Análisis y Diagnóstico de la Fauna Silvestre de

Andalucía (CAD) para su estudio postmortem. En total se analizaron 25 muestras procedentes de 22 ejemplares de buitre leonado, entre los años 2012 y 2022. Las necropsias y toma de muestras fueron realizadas en el CAD. Las muestras seleccionadas fueron remitidas al Laboratorio Analítico Bioclínico (LAB), para el análisis de una batería de AINES y compuestos antimicrobianos. Los resultados obtenidos fueron negativos o menores del límite de detección de la técnica en todas las muestras analizadas excepto en dos, en las que se detectaron residuos de dos antiinflamatorios no esteroideos, Flunixin y Ácido acetil salicílico. En el primer caso el individuo presentó lesiones de gota visceral, similares a las reportadas en buitres leonados tras ingesta de otros AINES (diclofenaco). En el segundo caso se trató de un buitre leonado muerto por colisión, que no presentaba otras lesiones distintas del traumatismo. Los resultados obtenidos durante este periodo implican que, al menos en las provincias y especie estudiada, estos compuestos pueden ser un riesgo y requieren de un estudio más amplio en cuanto a especies de aves y área geográfica.

**Palabras clave:** antiinflamatorios no esteroideos, antimicrobianos, buitre leonado, vigilancia pasiva

### VE-C4) MERCURIO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES DE DELFINES DEL MAR MEDITERRÁNEO Y SU IMPLICACIÓN CON BIOMARCADORES NEUROQUÍMICOS.

Emma Martínez-López<sup>1,2\*</sup>, Gabriel López-Berenguer<sup>1</sup>, Sara Salcedo<sup>1</sup>, José Peñalver<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Área de Toxicología, Universidad de Murcia <sup>2</sup> Instituto de Investigación biomédica de la Región de Murcia (IMB-Arrixaca). <sup>3</sup> Servicio de Agricultura y Pesca, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM). (emmaml@um.es)

La mayoría de los mamíferos marinos son altamente inteligentes, con comportamientos y estructuras sociales complejas. A pesar de que su grado real de inteligencia es aún discutido, los cetáceos han demostrado poseer un desarrollo de corteza cerebral y un cociente de encefalización que compiten y en algunos casos superan a los de cualquiera de los homínidos no humanos y humanos. El Hg puede afectar al funcionamiento normal del sistema nervioso central incluso en concentraciones extremadamente bajas a través de una amplia variedad de mecanismos de toxicidad. Éstos incluyen alteraciones en las actividades enzimáticas de la acetilcolinesterasa (AChE), la actividad de la monoamino oxidasa (MAO), la producción de especies reactivas de oxígeno o la alteración del sistema antioxidante celular. En el presente trabajo, analizamos cerebros de 20 delfines frescos varados en la costa mediterránea occidental para determinar las concentraciones de Hg, así como los niveles de AChE, MAO y algunos marcadores de estrés oxidativo como malonildialdehído (MAO) y catalasa (CAT) en diferentes regiones cerebrales: cerebelo (hemisferio cerebeloso y vermis), lóbulo occipital, temporal, parietal y frontal, tronco cerebral y diencéfalo. El Hg detectado (rango 0,5-18 ppm) superó en su mayoría el umbral neurotoxicidad para los mamíferos. La acumulación en el cerebro siguió el siguiente patrón: corteza cerebral > cerebelo > tronco cerebral. Esta distribución sugiere que las diferencias en la acumulación de Hg entre regiones cerebrales podrían deberse a diferencias en la concentración de moléculas que contienen grupos tiol en estas áreas. Por otro lado, observamos una correlación negativa entre las concentraciones de Hg y la AChE y CAT, en todas las regiones encefálicas. La reducción de la actividad de la AChE en organismos altamente expuestos al Hg puede representar una estrategia para garantizar que la neurotransmisión colinérgica se produzca dentro de un rango homeostático. Con respecto al sistema dopaminérgico, observamos un aumento significativo de la actividad de la MAO, siendo mayoritariamente afectada la isoenzima A relacionada con desórdenes comportamentales, antisociales y agresiones. Este hallazgo es más evidente en el córtex.

**Palabras Clave:** mercurio, cetáceos, neurotoxicidad, metales, biomarcadores

### VE-C5) NECROPTOSIS, UNA RUTA DE MUERTE CELULAR

**ALTERNATIVA, EN LA PROPAGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Álvarez-Bardón, M., García-Fernández, N., Soh, C., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, R.M., Balaña Fouce, R.  
*Dpt. CC. Biomédicas, Universidad de León (rbalf@unileon.es)*

La respuesta inmune del organismo desempeña un papel importante en el control de la propagación de enfermedades infecciosas. Se ha demostrado que la necroptosis, un tipo de muerte celular programada inflamatoria, podría haber surgido como un componente clave en la resistencia contra patógenos, ya que su activación se produce en respuesta a señales celulares de daño o a la presencia de agentes infecciosos. En la vía de la necroptosis no se va a producir la mediación de la cascada de caspasas en la formación de vesículas apoptóticas, sino que la membrana celular va a romperse secretando citoquinas inflamatorias. RIPK1 y RIPK3 son dos proteínas esenciales en la necroptosis que se asocian para inducir la formación del complejo MLKL, que forma poros en la membrana plasmática, provocando su desestabilización, y la liberación de componentes celulares y citoquinas que desencadenan una respuesta inmune.

Se utilizó un modelo de infección por macrófagos para estudiar la muerte celular y la liberación de moléculas inflamatorias en respuesta a la infección por el protozoo *Leishmania infantum*, responsable de la leishmaniosis visceral humana. El proceso de necroptosis se desencadenó mediante el uso de inhibidores pan-caspasa (Z-VAD-FMK), en combinación con lipopolisacárido (LPS) y de compuestos que bloquean la función de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). En respuesta a estos tratamientos, *Leishmania* fue capaz de modular el proceso de muerte celular necroptótica, ya que las células infectadas presentaron tasas de muerte significativamente menores en comparación con las células no infectadas. Por lo tanto, se concluye que *Leishmania* es capaz de manipular al hospedador, inhibiendo sus rutas de muerte. De esta forma, el parásito puede persistir en el interior de las células, evitando así su reconocimiento por parte de las células del sistema inmunitario del hospedador.

**Palabras clave:** Citotoxicidad, necroptosis, moléculas pro-inflamatorias, caspasa, citoquinas.  
MICINN PID2020-119031RB-100

## ACTAS DE LAS IX JORNADAS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA, 2024

**Comité Científico:** Dra. María José Ruiz Leal, Dra. Houda Berrada, Dra. Mónica Fernández-Franzón, Dra. Emilia Ferrer, Dra. Ana Juan-García, Dra. Cristina Juan García, Dra. Josefa Tolosa, Dr. Yelko Rodríguez Carrasco.

**Comité Organizador:** Dr. Francisco Martí-Quijal, Dra. Noelia Pallarés Barrachina, Dra. Cristina Fuentes López, Luna Bridgeman-Torres, Felipe Franco Campos, Mara Calleja Gómez, Raquel Peñalva-Olcina, Albert Sebastià Duque, Paula Llorens Castello, Carmen Martínez Alonso, Mercedes Taroncher Ruiz.

*Organizadas por la Sección de Seguridad Alimentaria de la Asociación Española de Toxicología (AETOX) el 12 de marzo de 2024.*

**Lugar de celebración:** Salón de Grados de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universitat de València.

Colocación de carteles en el Hall de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

### CONFERENCIA

#### ENZIMAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. OBTENCIÓN, INMOVILIZACIÓN Y ALGUNOS EJEMPLOS DE APLICACIÓN

**I. Hernando Hernando**

*Grupo de Microestructura y Química de Alimentos, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos FoodUPV, Universitat Politècnica de València*

Las enzimas de origen microbiano tienen cada vez más relevancia debido a que poseen una acción muy específica en su catálisis y una actividad predecible y controlable. Estos biocatalizadores son producidos por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, y se obtienen a través de procesos de fermentación. El interés en las enzimas microbianas radica, además, en su facilidad de producción, la posibilidad de manipulación genética para mejorar sus propiedades, y su capacidad para funcionar en diversas condiciones extremas de pH y temperatura.

La inmovilización es una técnica que mejora la estabilidad de las enzimas y permite su reutilización. Los métodos de inmovilización más importantes se dividen en químicos, como la adsorción y el entrecruzamiento, y físicos, como el atrapamiento y la encapsulación. Algunos métodos de inmovilización son fuertes e imparten gran estabilidad a las enzimas, aunque pueden modificar su centro activo disminuyendo la actividad catalítica; otros métodos de inmovilización son más débiles, en este caso la enzima es menos estable, pero tiene una elevada actividad. La elección de un método u otro depende de la aplicación final de la misma.

En la industria de alimentos, se emplean varias enzimas de origen microbiano. Las amilasas se usan para la conversión de almidón en azúcares, fundamentales en procesos fermentativos como la panificación, y para la producción de jarabes de glucosa y fructosa. Las proteasas juegan un papel crucial en la fabricación de quesos y en el ablandamiento de carnes, mejorando la textura y el sabor de los productos. Las lipasas, por su parte, se utilizan en la modificación de grasas y aceites, así como en la producción de sabores y aromas en productos lácteos y panificación. Otras enzimas más específicas como la transglutaminasa entrecruzan proteínas permitiendo la fabricación de piezas preformadas de carne o de pescado y la panificación sin gluten.

**Palabras clave:** biotecnología, proteasas, lipasas, carbohidrasas, transglutaminasa.

### COMUNICACIONES ORALES

*Moderadoras: Dras. Ana Juan-García y Emilia Ferrer García*

#### 01) INVESTIGATING THE IMPACT OF BILBERRIES ON OCHRATOXIN A BIOACCESSIBILITY AND CYTOTOXICITY IN GASTROINTESTINAL MODELS *IN VITRO*

**Paşca D<sup>1,2</sup>**, Frangiamone M<sup>1</sup>, Loghin F<sup>3</sup>, Miere D<sup>2</sup>, Vila-Donat P<sup>1</sup>, Manyes L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Valencia, 46100 Burjassot, València, Spain*

<sup>2</sup>*Department of Bromatology, Hygiene, Nutrition, Faculty of Pharmacy, "Iuliu Haşieganu" University of Medicine and Pharmacy, 6 Louis Pasteur, 400349 Cluj-Napoca, Romania*

<sup>3</sup>*Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, "Iuliu Haşieganu" University of Medicine and Pharmacy, 6 Louis Pasteur, 400349 Cluj-Napoca, Romania*

[Lara.manyes@uv.es](mailto:Lara.manyes@uv.es)

The mycotoxin presence in grains and grain-based products continues to pose a major concern for food safety. Utilizing food ingredients rich in antioxidants, such as bilberries (*Vaccinium myrtillus* L. species, VM), may offer a strategy to not only reduce the content of mycotoxins but also to mitigate their adverse effects. This study aimed to assess the impact of bilberries on reducing the bioaccessibility and cytotoxicity of ochratoxin A (OTA). Four bread typologies were prepared and subjected to an *in vitro* digestion model: Control (C), VM, OTA (15.42±0.95 mg/kg), and OTA-VM (17.09±0.75 mg/kg). To evaluate the cytotoxicity of the gastrointestinal digests and the potential influence of bilberries at the cellular level, a cell viability assessment using differentiated Caco-2 cells was conducted, alongside cytofluorometric analyses using the Jurkat cell line exposed for 7 days to 1/10 dilutions. The results indicated that the presence of VM reduced OTA bioaccessibility by 16-19% at the intestinal level. Compared to the OTA digest, the OTA-VM digest enhanced cell viability at all exposure times. In terms of flow cytometry, no notable changes were observed in the cell cycle phases. However, in apoptosis/necrosis assessments, a significant increase in cell death was noted for the OTA digest, whereas the addition of bilberries reduced it by 9%. These findings were further supported by reactive oxygen species (ROS) analysis and mitochondrial ROS generation, showing a significant reduction (3.7-fold in ROS and 21% in mitochondrial ROS) for the OTA-VM digest compared to the OTA digest. Both OTA and the functional ingredient led to an increase in mitochondrial mass. Therefore, it can be concluded that bilberries exhibit high potential as a functional ingredient, confirming their protective effect against OTA exposure under *in vitro* conditions with a realistic experimental design.

**Acknowledgment:** The results are part of the project PID2022-140722OB-I00, funded by MCIU /AEI /10.13039/501100011033 /FEDER, EU.

#### 02) BREAD ENRICHED WITH GARLIC DECREASES AFLATOXIN B1 OXIDATIVE STRESS AFTER DIGESTION IN JURKAT CELLS

**Lázaro A<sup>1</sup>**, Frangiamone M<sup>1</sup>, Maietti A<sup>2</sup>, Cimbalo A<sup>1</sup>, Vila-Donat P<sup>1</sup>, Manyes L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biotech Agrifood, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Valencia, 46100 Burjassot, València, España*

<sup>2</sup>*Department of Chemical, Pharmaceutical and Agricultural Science, University of Ferrara, Via Luigi Borsari 46, 44121, Ferrara, Italy*

[alvaro.lazaro@uv.es](mailto:alvaro.lazaro@uv.es)

Aflatoxin B1 (AFB1) is one of the 12 legislated mycotoxins in food and feed in Europe. Studies have demonstrated its acute and chronic toxicity, leading to liver damage, nutritional dysfunctions, immunosuppression and cancer. It has been observed that bioactive compounds from food have the ability to reduce the bioaccessibility of mycotoxins and modulate their toxic effects. Voghiera garlic was chosen for this study due to its beneficial effects related to sulfur-containing compounds, high content of trace elements and enzymes. The present work focuses on the study of cytotoxicity caused by AFB1 using intestinal digests of bread contaminated by fungal growth and enriched or not with fresh Voghiera garlic (2% w/w). Jurkat human

lymphoblastoma cells were exposed to four treatments (control, garlic, AFB1 and AFB1-garlic) of intestinal digests diluted 1/10 (0.7 µM AFB1) in culture medium for 7 days. All flow cytometry assays were carried out using the MACSQuant 16 instrument (Miltenyi Biotec). Cell cycle, apoptosis-necrosis, reactive oxygen species, mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial mass were conducted by using DNA Reagent Kit, Annexin V-FITC Kit, H2DCFDA Reagent, Green FM MitoSOX Red Reagent and MitoTracker™, respectively. Statistical analysis of the results was performed using Student's T-test for paired samples in Excel 2016. AFB1 exposure promoted an increase of cells in the S phase, while the addition of garlic decreases the % of cells (23 vs. 19%, respectively). In addition, a reduction in apoptosis/necrosis by 16%, cellular reactive oxygen species by 71%, and mitochondrial reactive oxygen species by 25% was observed comparing AFB1 to AFB1-garlic. Comparing to control, mitochondrial mass was around 8% less after AFB1 exposure and 12% less after AFB1-garlic. In conclusion, the inclusion of garlic as a functional ingredient helped to alleviate the cytotoxic effects of AFB1.

**Keywords:** mycotoxin, bioactive compounds, *in vitro*, flow cytometry.

### O3) ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE TOXICIDAD GLIOTOXINA, OCHRATOXINA A Y SU COMBINACIÓN EN EL MODELO *IN VITRO* DAPHNIA MAGNA

Penalva-Olcina, R<sup>1,2</sup>; Juan, C<sup>1</sup>; Fernández- Franzón, M<sup>1</sup>; Vehniäinen, E<sup>2</sup>; Juan-García, A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, España

<sup>2</sup>Department of Biological and Environmental Science, PO, Box 35, FI-40014 University of Jyväskylä, Finland

Raquel.penalva-olcina@uv.es

La gliotoxina (GTX) y la ochratoxina A (OTA) son toxinas producidas de forma natural por hongos y son conocidas por sus posibles riesgos para la salud. El modelo invertebrado *in vitro* de *D. magna* tiene similitudes con el desarrollo de efectos tóxicos en mamíferos y resultó de interés en este trabajo para el estudio de los mecanismos de acción por los cuales GTX, OTA y su combinación ejercen toxicidad. Los ensayos que se realizaron fueron: a) prueba de toxicidad aguda tras la exposición de *D. magna* durante 96h; b) ritmo cardíaco mediante el registró del latido del corazón de las dafnias tras la exposición a micotoxinas y c) evaluación de toxicidad crónica, descendencia y tasa de crecimiento tras 21 días de exposición. GTX mostró una disminución de la supervivencia con el tiempo, con valores de IC<sub>50</sub> de 0.08 µM produciendo una disminución en la frecuencia cardíaca del 5% y una disminución del número de crías del 20%. Para OTA la IC<sub>50</sub> obtenida fue de 0.2 µM aunque no se obtuvieron efectos sobre el ritmo cardíaco. La combinación binaria mostró una supervivencia reducida después de 48 h tanto en el estudio de efecto agudo como crónico. Con los datos obtenidos se observa que tanto GTX como OTA y su combinación ejercen efectos tóxicos a corto y largo plazo sobre *D. magna* alterando tanto el ritmo cardíaco como su capacidad de reproducción, lo que pone de manifiesto el interés de estas micotoxinas, así como su efecto en modelos *in vitro* que se encuentran de forma natural en medios acuáticos y son la base de la cadena alimentaria de muchas especies que habitan en él. Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España PID2020-115871RB-100, la Conselleria d'Educació, Universitats i Ocupació de la Generalitat Valenciana a través del proyecto CIAICO 2022/199. RPO quiere agradecer a la Alianza FORTHEM por la ayuda para la realización estancia de investigación en la Universidad de Jyväskylä y a la Universidad de Valencia por la beca de doctorado "Atracció de Talent".

**Palabras clave:** *Daphnia magna*, Ochratoxina A, Gliotoxina, Micotoxinas.

### O4) EVALUATION OF THE SAFETY AND BIOACTIVE COMPOUNDS OF ALPECHÍN SAMPLES FROM SPAIN

Martínez-Terol, S; Barba, FJ; Pallarés, N; Berrada, H; Ferrer, E;

Martínez-Culebras, PV

Sermart2@uv.es

Research group in Innovative Technologies for Sustainable Food (ALISOST), Department of Preventive Medicine and Public Health, Food Science, Toxicology and Forensic Medicine, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot, 46100 València, Spain

mercedes.taroncher@uv.es

Olive oil production generates a significant by-product, olive mill wastewater (OMW), known as *alpechín*, ranging from 10 to over 30 million cubic metres per year. Despite its environmental challenges due to poor biodegradability and high phytotoxicity from phenolic compounds, OMW contains bioactive compounds that offer opportunities for valorisation and application in the agro-food industry. The aims of this study are to optimise the conventional extraction of phenolic fractions present in the *alpechín* from different Spanish regions, to characterise the total phenolic content and to determine their mineral and heavy metal content for toxicity assessment. To carry out the study, eight samples of olive mill wastewater (OMW) and five samples of *alpechín* sludge from abandoned ponds in the Mediterranean area and southern Spain were analysed. The total phenolic content of the extracts was analysed using spectrophotometric techniques. For elemental identification and quantification was carried out by ICP-MS. Samples collected from ponds in Toledo, Beneixama (Alicante) and Luque (Córdoba), showed higher contents of total phenolic compounds. The highest value was found in the samples of TED-16 (18.9 g/kg) and the lowest in TED-9 (0.6 g/kg). In particular, hydroxytyrosol and tyrosol, were consistently identified in all TED samples. The predominant presence of potassium and calcium in OMW was noted. All the extracts analysed have heavy metal contents below the maximum limits set for foodstuffs by the legislation. The resulting extracts from fresh matrices did not exceed 2% of the heavy metal content, remaining in the solid residues for the solid *alpechín* and in the aqueous fractions for the liquid *alpechín*.

**Keywords:** olive mill wastewater (OMW), *alpechín*; phenolic compounds; mineral, heavy metal

**Acknowledgements:** Sergio Martínez-Terol would like to acknowledge TED2021-129481B-C33 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the European Union "NextGenerationEU"/PRTR) for his contract.

### Bibliography:

Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F., Michaud P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*. 48(10):1532–52.

De Marco E., Savarese M., Paduano A.; Sacchi R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem*. 104, 858–867

### O5) ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ACRILAMIDA EN MUESTRAS DE PALOMITAS

Sebastia A<sup>1</sup>, Fernández-Matarredona C<sup>1</sup>, Barba FJ<sup>1</sup>, Berrada H<sup>1,2</sup>, Ferrer E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Tecnologías Innovadoras para la Alimentación Sostenible (ALISOST)

<sup>2</sup>Grupo de Investigación Métodos alternativos para determinar efectos tóxicos y evaluación del riesgo de contaminantes y mezclas (RiskTox)

Albert.sebastia@uv.es

La Comisión Europea publicó en 2019 una lista de alimentos en los que se debe controlar la presencia de acrilamida (AA), sustancia tóxica formada durante el procesado de los alimentos. Entre estos alimentos se encuentran los productos de aperitivo a base de cereal como las palomitas [1]. Este snack es ampliamente consumido ya bien sea en casa o en el cine y su ingesta se ha visto aumentada en los últimos años [2]. En los lineales de los establecimientos alimentarios es habitual encontrar palomitas de microondas de mantequilla, saladas, dulces y para cocinar con palomitera o sartén. Por tanto, el objetivo de este estudio es realizar un estudio de mercado para determinar qué tipo de

palomitas contiene un mayor contenido de AA. Para ello, 46 muestras de palomitas han sido adquiridas de diversos establecimientos de España y cocinadas en el laboratorio siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior determinación. La extracción se ha realizado a través de una extracción líquida mediante agua y la cuantificación se ha llevado a cabo a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron que no hay diferencia significativa en el contenido de AA entre los distintos sabores de palomitas, no obstante, si existe diferencia entre los niveles de AA encontrados en las palomitas cocinadas en microondas y aquellas destinadas a ser cocinadas en palomitera o sartén. De los datos obtenidos podemos concluir que es importante controlar la presencia de AA en las palomitas y que el método de cocción, así como los ingredientes presentes en la bolsa de las palomitas de microondas pueden ser un factor importante para reducir los niveles de AA en este popular snack.

**Palabras clave:** Acrilamida, palomitas, estudio de mercado, HPLC-MS

**Agradecimientos:** Esta investigación se encuentra dentro de proyecto AICO/2021/037 otorgado por la Generalitat Valenciana (España). Albert Sebastià agradece al programa de becas predoctorales de la Universidad de Valencia por su beca "Atracció de Talent".

#### **Bibliografía :**

European Commission. Commission Recommendation (EU) 2019/1888. 2019.

MAPA. Base de datos de consumo. <https://www.mapa.gob.es/app/consumo-en-hogares/consulta11.asp> (accessed December 4, 2023).

### **06) MODELO 3D DE NEURONAS COLINÉRGICAS A PARTIR DE LA DIFERENCIACIÓN DE CELULAS SH-SY5Y PARA ESTUDIOS DE NEUROTOXICIDAD**

**Franco-Campos F**<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Carrasco Y<sup>1,2</sup>, Ruiz, MJ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Métodos alternativos para determinar efectos tóxicos y evaluación del riesgo de contaminantes y mezclas. <sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología y Química de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, España [Felipe.franco@uv.es](mailto:Felipe.franco@uv.es)

Los cultivos celulares *in vitro* son esenciales para evaluar la citotoxicidad de compuestos como plaguicidas y micotoxinas, reduciendo la utilización de ensayos con animales. En la actualidad los modelos esféricos (3D) son cada vez más utilizados por acercarse más a la realidad de un sistema *in vivo* dado, principalmente por la presencia de matriz extracelular que favorece la comunicación e interacción celular. Sin embargo, la diferenciación de líneas celulares en modelos 3D es más compleja que en modelos en monocapa (2D), por lo que la aplicación de dichos modelos a los estudios de neurotoxicidad es un campo de gran relevancia para el avance de la ciencia en neurotoxicidad, como por ejemplo, la diferenciación de células neuronales SH-SY5Y para obtener fenotipos dopaminérgicos o colinérgicos maduros. El objetivo de este trabajo es comparar la presencia de neuronas colinérgicas en esferoides de células SH-SY5Y en modelos 3D con células sin diferenciación y diferenciadas en neuronas colinérgicas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los esferoides diferenciados presentan expresión de fenotipo colinérgico maduro de células SH-SY5Y tras 18 días de tratamiento con vitaminas y factores de diferenciación específicos. Además, dichos esferoides revelan una alta proporción de células en fase G0/G1 (aproximadamente 85%) de forma similar a lo que ocurre en esferoides sin diferenciar. Así mismo, la tinción de Nissl confirma la presencia de neuronas en ambas condiciones, con y sin diferencias, aunque los marcadores de neuronas colinérgicas (por inmunofluorescencia y western blot) aumentan considerablemente sólo en esferoides con células diferenciadas. Por tanto, podemos concluir que este modelo 3D con expresión de fenotipo colinérgico maduro de células SH-SY5Y es un modelo prometedor que permite replicar con precisión la arquitectura *in vivo* de los sistemas neuronales naturales. Además, este complejo modelo esférico permitirá un avance significativo en la

evaluación de la toxicidad de compuestos neurotóxicos y la comprensión de la neurotoxicidad de dichos compuestos.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-115871RB-I00) MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Franco-Campos F, gracias a la beca "Santiago Grisóla (CIGRIS/2021/073)".

**Palabras clave:** Esferoides - SH SY5Y – Neuronas – Diferenciación

## **COMUNICACIONES TIPO CARTEL**

### **C1) EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE AFLATOXINA B1 Y POLIFENOLES EN UNA BEBIDA VEGETAL DE CHUFA**

**Llorens P**<sup>1</sup>, Pardo O<sup>2</sup>, Juan-García, A<sup>1</sup>, Moltó JC<sup>1</sup>, Juan C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Química y Toxicología Alimentarias, Universidad de Valencia, España

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, España

[Paula.llorens@uv.es](mailto:Paula.llorens@uv.es)

La horchata de chufa (TNB) es una bebida vegetal con propiedades digestivas y rica en polifenoles, su consumo se ha asociado a beneficios para la salud y a un perfil microbiano beneficioso. Estas propiedades cobran interés frente a sustancias tóxicas que de forma natural se pueden encontrar en los alimentos, a pesar de los controles y medidas de prevención implementadas, y que los consumidores pueden ingerir a niveles traza de forma crónica, como son algunas micotoxinas. Entre ellas, la aflatoxina B1 (AFB1) es de las más detectadas en productos de importación y para las que mayores alertas al año se han registrado por el Sistema de Alerta Rápido para Alimentos y Piensos de la UE (RASFF). La AFB1 es carcinógena del grupo 1 (IARC, 1987) que plantea importantes amenazas para la salud, principalmente a través de fuentes alimentarias contaminadas.

El presente trabajo evalúa la interacción entre la AFB1 y los polifenoles presentes en TNB en relación con su absorción intestinal *in vitro*. Para ello se hizo una digestión *in vitro* de TNB (Brodkorb et al., 2019), y AFB1 a la concentración de 40 µM. Para el estudio de biodisponibilidad se utilizó células Caco-2 y se determinó la AFB1 mediante LC-MS/MS, y los polifenoles con LC-UV/VIS.

Se observó que la absorción de AFB1 en presencia de TNB tiene un incremento del 6%, sugiriendo una posible potenciación por los componentes presentes. Por el contrario, los polifenoles de la TNB (hexósido de ácido cafeico, acil-b-D-glucósido de ácido ferúlico, ácido trans-ferúlico, derivado de epicatequina y ácido trans-cinámico) mostraron una disminución media del 29% en presencia de AFB1, lo que apunta a un mecanismo de absorción competitivo o a alteraciones en la permeabilidad de la membrana debidas a la presencia de la micotoxina.

**Palabras clave:** Aflatoxina B1, Horchata, Caco-2, Polifenoles, Biodisponibilidad.

**Agradecimientos:** Ministerio Español de Ciencia e Innovación proyecto PID2020-115871RB-I00; Conselleria d'Educació, Universitat I Ocupació de la GV, proyecto CIAICO2022/199; Atracció de talent, UV-INV\_PREDOC-1911764

#### **Bibliografía:**

Brodkorb, A. et al., (2019). *Nature protocols*, 14(4): 991–1014.

### **C2) EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESFEROIDES SH-SY5Y EXPUESTOS AL ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO**

**Martínez-Alonso C, Rodríguez-Carrasco Y, Ruiz, MJ.**

*Research Group in Alternative Methods for Determining Toxics Effects and Risk Assessment of Contaminants and Mixtures (RiskTox). Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Valencia, Spain.*

[carmen-martinez-alonso@uv.es](mailto:carmen-martinez-alonso@uv.es)

El ácido ciclopiazónico (ACP) es una micotoxina producida por determinadas especies fúngicas, predominantemente pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, que tienen la capacidad de

colonizar alimentos y piensos. En los últimos años, el ACP ha generado una creciente atención debido a sus potenciales efectos toxicológicos en humanos y animales. Dada la creciente necesidad de mejorar las evaluaciones de riesgos, existe una demanda de modelos celulares *in vitro* avanzados que puedan simular mejor la complejidad arquitectónica de los tejidos y órganos naturales, como los esferoides tridimensionales. Este estudio tuvo como objetivo evaluar alteraciones en la forma y el tamaño de los esferoides formados con células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestos al ACP (500-1500 nM) después de 24, 48 y 72h de exposición, utilizando un microscopio de luz invertida con la finalidad de obtener medidas morfológicas. Los resultados indicaron que la exposición del ACP condujo a una progresiva disgregación de la forma original de los esferoides a todas las concentraciones y tiempos de exposición probados. Por otro parte, se observó un aumento significativo en el diámetro de los esferoides inducido por la exposición al ACP durante 24 y 28h a todas las concentraciones ensayada, probablemente debido a la reducción de las interacciones célula-célula, a la pérdida de uniones y a la degradación de la matriz extracelular después del tratamiento con el ACP. Sin embargo, después de 72h de exposición a la micotoxina no se observó diferencias significativas en el diámetro respecto al control a ninguna concentración ensayada. Esto podría indicar una respuesta adaptativa a la exposición del ACP tras 72h.

**Palabras Clave:** ACP, esferoides, SH-SY5Y, morfología.

**Agradecimiento:** Este trabajo fue financiado por el Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2020-115871RB-I00) y Agencia Estatal de Investigación (AEI/10.13039/501100011033). C. Martínez Alonso agradece a la F.P.U. Beca (FPU21/04950) otorgada por el Ministerio de Educación.

### C3) EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA TRAS LA EXPOSICIÓN A CADMIO, ARSÉNICO Y SUS COMBINACIONES BINARIAS CON CILINDROSPERMOPSINA.

Casas-Rodríguez A<sup>1</sup>, Díez-Quijada L<sup>1</sup>, Pichardo S<sup>1</sup>, Cameán AM,<sup>1</sup> Jos A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.  
[acasasr@us.es](mailto:acasasr@us.es)

La CYN es una cianotoxina con cada vez más repercusión a nivel mundial debido a su amplia distribución, bioacumulación y efectos tóxicos. Estudios previos sugieren que existe una interacción entre CYN y otros contaminantes químicos. Por ello, el objetivo del trabajo fue evaluar el impacto de As, Cd y sus combinaciones con CYN en las líneas celulares humanas del sistema inmune Jurkat y THP-1. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad en los que As y Cd disminuyeron significativamente la viabilidad de ambas líneas celulares tras la exposición durante 24h, obteniendo valores de CE<sub>50</sub> en Jurkat de 13.15±1.97 y 36.92±3.77µM, respectivamente. Respecto a THP-1, las CE<sub>50</sub> fueron de 46.48±0.17 y 55.09±4.98µM. Se estudió el efecto de las mezclas sobre la diferenciación de monocitos en macrófagos tras 24 y 48h. Ambos compuestos por separado, y sus mezclas con CYN, redujeron significativamente el porcentaje de células diferenciadas. También, se estudió el efecto en la expresión de ARNm de diferentes interleuquinas (IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α e INF-γ). En la línea celular Jurkat, el Cd produjo un aumento de la expresión de todos los genes, mientras que As sólo incrementó la expresión de IL-8. La exposición a las combinaciones aumentó la expresión de IL-2 e INF-γ. En cuanto a THP-1, Cd provocó un aumento de la expresión de TNF-α e INF-γ, mientras que As incrementó la expresión de IL-8 e INF-γ. La exposición a las mezclas aumentó la expresión de IL-8 e INF-γ, mientras que la expresión de TNF-α disminuyó con la combinación de Cd+CYN. Estos resultados indican que las mezclas de contaminantes producen efectos diferentes a las de los tóxicos individuales, debiéndose tener en cuenta para una correcta evaluación del riesgo.

**Palabras clave:** Jurkat, THP-1, arsénico, cadmio, cilindropermopsina.

**Agradecimientos:** MICINN (PID2019-104890RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) por su financiación. A.C.R agradece al MICINN por su beca predoctoral (PRE2020-094412).

### C4) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD *IN VITRO* DE MICOTOXINAS Y SU IMPACTO EN LA SALUD: UN ANÁLISIS DE LA ÚLTIMA DÉCADA

Moyano-López, Claudia; Bridgeman, Luna; Penalva-Olcina, Raquel; Juan-García, Ana

Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia y Ciencias de los Alimentos, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Valencia, España  
[claumolo@alumni.uv.es](mailto:claumolo@alumni.uv.es)

Las micotoxinas, metabolitos fúngicos derivados de *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium*, amenazan la salud del consumidor por la ingesta de un alimento, posiblemente contaminado<sup>1</sup>; además su copresencia podría agravar estos efectos<sup>2</sup>. Esta revisión recoge estudios de toxicidad *in vitro* de micotoxinas, publicados en revistas científicas en los últimos 10 años. Se emplearon las bases de datos: Web of Science y PubMed y las palabras clave fueron: "mycotoxins", "*in vitro*", "cytotoxicity", "cell line" y "oxidative stress". El objetivo se centró en publicaciones de revistas del ámbito de la toxicología alimentaria, entre 2013 y 2023. Los resultados revelan que el ensayo MTT es el más utilizado para evaluar la citotoxicidad de micotoxinas. El daño oxidativo, vinculado con enfermedades en humanos conduce a analizar: la generación de especies reactivas de oxígeno mediante el ensayo H2-DCFDA, el índice de peroxidación lipídica por el método TBARS, la medida del potencial de membrana con el fluorocromo JC-1 y los procesos de apoptosis y necrosis en diversas líneas celulares, y de forma individual y combinada. Estos últimos tres ensayos se han realizado, principalmente, por citometría de flujo. Patulina, Citrinina, Ocratoxina A, Zearalenona, Fumonisina B1 y Beauvericina fueron las micotoxinas más estudiadas y sus efectos tóxicos variaron en función del tiempo y la concentración de exposición utilizada. Estos revelan la importancia de realizar estudios que permitan ampliar el conocimiento de las micotoxinas y sus efectos, así como conocer las acciones protectoras para el consumidor. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación PID2020-115871RB-I00 y Conselleria d'Educació, Universitats i Ocupació de la Generalitat Valenciana proyecto CIAICO2022/199.

**Palabras clave:** "mycotoxins"; "*in vitro*"; "cytotoxicity"; "cell line"; "oxidative stress".

#### Bibliografía:

Boudergue, C. *et al.* Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications* **6**, 22E (2009).

Karsauliya, K. *et al.* Co-occurrence of mycotoxins: A review on bioanalytical methods for simultaneous analysis in human biological samples, mixture toxicity and risk assessment strategies. *Toxicol* **218**, 25–39 (2022).

### C5) ASSESSMENT OF NANOENCAPSULATED CAROTENOIDS: IMPLICATIONS FOR AFLATOXIN B1 AND OCHRATOXIN A IN BIOACCESSIBILITY, BIOAVAILABILITY, AND CELLULAR VIABILITY

Pinna, N<sup>1</sup>; Blasi, F<sup>1</sup>; Schoubben, A<sup>1</sup>; Vila-Donat, P<sup>2</sup>; Manyes, L<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, 06126 Perugia, Italy

<sup>2</sup> Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de València, 46100 Burjassot, València, Spain

[Lara.manyes@uv.es](mailto:Lara.manyes@uv.es)

Mycotoxins represent a significant hazard to human and animal health, prompting extensive research into mitigating their detrimental impacts. This study focuses on aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA), both tightly regulated in Europe due to their severe toxicological effects. The aim of this study was to investigate the potential benefits of

carotenoids encapsulated in nanostructured lipid carriers (NLCs) on the bioaccessibility, bioavailability, and cellular damage induced by these two mycotoxins. For the experimental design, a lyophilized formulation of carotenoid-loaded NLCs was subjected to an *in vitro* digestion, combined with two different types of fungal-contaminated bread. Intestinal digests were analyzed via HPLC coupled with fluorescence detection. Regarding bioaccessibility assessments, results revealed no significant differences between digests from bread with and without NLCs for both AFB1 ( $1.36 \pm 0.08$  mg/L vs.  $1.39 \pm 0.04$  mg/L) and OTA ( $1.33 \pm 0.03$  mg/L vs.  $1.46 \pm 0.01$  mg/L). For bioavailability, Caco-2 intestinal cells differentiated for 21-days on transwells supports, were exposed to the different intestinal digests for 4 hours. AFB1 concentrations were  $0.39 \pm 0.12$  mg/L without NLCs and  $0.44 \pm 0.04$  mg/L with NLCs, while OTA concentrations were  $0.44 \pm 0.14$  mg/L without NLCs and  $0.41 \pm 0.02$  mg/L with NLCs; showing also for bioavailability no significant differences. Cell viability assays using MTT assay showed no improvement in AFB1-exposed cells with NLCs, while OTA-exposed cells exhibited increased viability from 11% to 22% at 48 hours and from 9% to 13% at 72 hours when NLCs were present in the intestinal digest. In summary, NLCs did not affect mycotoxin bioaccessibility or bioavailability but slightly enhanced cellular survival in OTA-exposed cells. These findings highlight the complex interplay between carotenoids and mycotoxin dynamics, suggesting potential strategies for mycotoxin toxicity mitigation.

**Keywords:** mycotoxins; carotenoids; *in vitro* digestion; Caco-2; HPLC-FLD

**Acknowledgment:** The results are part of the project PID2022-140722OB-I00, funded by MCIU /AEI /10.13039/501100011033 /FEDER, EU.

#### C6) *IN VITRO* STUDIES ON THE INTESTINAL TOXICITY OF DIETARY 5-HYDROXYMETHYLFURFURAL

de la Fuente, B.<sup>1,2</sup>, Vélez, D.<sup>2</sup>, Berrada, H.<sup>1</sup>, Barba, F.J.<sup>1</sup>, Devesa, V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Preventive Medicine and Public Health, Food Science, Toxicology and Forensic Medicine Department, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, 46100 València, Spain

<sup>2</sup> Institute of Agrochemistry and Food Technology, Calle Agustín Escardino 7, 46980 - Paterna, Spain.

[Beatriz.fuente@uv.es](mailto:Beatriz.fuente@uv.es)

5-hydroxymethylfurfural (HMF) is considered a food contaminant generated during the manufacturing and storage of thermally processed foods. It is found in relevant concentrations (mg/kg) in a wide variety of foodstuffs such as bakery products, coffee, chocolate, dried fruits, balsamic vinegar, and plum beverages. The frequent intake of HMF implies a prolonged contact with the intestinal mucosa. However, studies on the toxicity of HMF at intestinal level are scarce.

The aim of this study was to assess the intestinal toxicity of a continuous exposure to HMF through an *in vitro* model that more faithfully simulate the complexity of the human intestinal mucosa. For this purpose, a bicameral system combining an epithelial monolayer (Caco-2 enterocytic cells and HT29-MTX mucosecretory cells) with immune cells (THP-1-derived macrophages) was exposed to HMF at dietary concentrations (100-3000 mg/L) for 7-10 days. Various toxicological endpoints were evaluated at the end of the exposure and compared to the values obtained in non-exposed cells.

Data on mitochondrial activity show that HMF does not affect the viability of epithelial cells at concentrations equal to or lower than 1000 mg/L. However, epithelial monolayers reduce their adherence capacity at concentrations equal to or higher than 800 mg/L. Immunocytochemistry and Alcian blue staining assays reveal that exposure to HMF (100-700 mg/L) leads to an increase in cellular volume, looser intercellular junctions, and a depletion in mucus-covered area in a dose-dependent manner. Furthermore, exposure to HMF generates an increase of intracellular ROS/RNS in intestinal and immune cells (up to 35%), and a major release of the cytokine IL-8 (up to 43%) compared to non-exposed cells. These preliminary results suggest that continuous contact of the intestinal mucosa with HMF can

induce a pro-oxidative and pro-inflammatory response by intestinal/immune cells, which could be responsible for damage to the epithelial structure, a situation prior to functional intestinal alterations.

**Keywords:** 5-hydroxymethylfurfural, intestinal toxicity, *in vitro* models, oxidative stress, inflammation

**Acknowledgements:** This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation grant number PID2020-115871RB-I00-ALI, and the Conselleria d'Educació, Universitats i Ocupació from Generalitat Valenciana: project CIAICO2021/037. Beatriz de la Fuente would like to acknowledge the Margarita Salas grant program from the University of Valencia (MS21-144)

#### C7) CONTAMINACIÓN DEL SUELO Y SEGURIDAD ALIMENTARIA: CASO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS AGRÍCOLAS VALENCIANOS

Fernández-Gómez E, Roca-Pérez L, Andreu-Sánchez O, Blancato G, Gamón M, Boluda R

Av Vicent Andrés i Estellés s/n, 46100 Burjassot (Universitat de València, Facultat de Farmàcia, Dept. Biologia Vegetal)

[efergo5@uv.es](mailto:efergo5@uv.es)

El 95% de los alimentos se originan en nuestros suelos. Uno de los principales desafíos para conseguir alimentos saludables, así como para alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible y de la Agenda 2030, radica en mejorar y preservar la calidad del suelo. Los suelos agrícolas valencianos están sometidos a una fuerte presión antrópica (industrialización, urbanizaciones, turismo y agricultura intensiva). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos que se originan debido a estas actividades y, mayoritariamente, por la quema de combustibles fósiles y rastrojos. Pueden acumularse en los suelos, son resistentes a la degradación y altamente tóxicos, pudiendo afectar al sistema suelo-cultivo. Se llevaron a cabo varias campañas de campo en municipios de l'Horta y La Ribera de València. El objetivo fue determinar y evaluar la presencia de 13 HAPs en muestras de suelos dedicados a distintos tipos de cultivos: arroz, cítricos y hortalizas. Se llevó a cabo un muestreo aleatorio en los principales municipios. Se realizó una extracción mediante el método QuEChERS y cuantificación por GC-MS/MS. Los compuestos más detectados fueron: Pireno, Criseno, Benzo(b)Fluoranteno y Benzo(a)Pireno (BaP). El valor de ΣHAPs varió entre 5 y 302 µg/kg; ambas concentraciones se encontraron en suelos dedicados al cultivo de cítricos. El 45% de las muestras presentaron BaP con concentraciones de 5,1 a 34,6 µg/kg; de éstas, cuatro superaron el límite tolerable para suelos agrícolas (20 µg/kg, según el RD 9/2005), este nivel de contaminación se asoció a un origen pirogénico mayoritario debido a vehículos seguido de la quema de biomasa. El hecho de que la contaminación afecte a algunos de nuestros suelos sugiere que puede influir, negativamente, sobre los alimentos allí producidos. Por ello, es necesario llevar a cabo el seguimiento de estos contaminantes en el sistema suelo-cultivo con el fin de evitar riesgos ecotoxicológicos y asegurar la calidad alimentaria.

**Palabras clave:** alimentos, suelos, contaminación, HAPs,

#### C8) ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE LA TOXINA T-2 EN CÉLULAS HEPG2

Taroncher M<sup>a,b</sup>, Rodríguez-Carrasco Y<sup>a,b</sup>, Ruiz MJ<sup>a,b</sup>

"Grupo de investigación de la UV Métodos alternativos para determinar efectos tóxicos y evaluación del riesgo de contaminantes y mezclas" (RiskTox; GIUV2021-513). <sup>b</sup>Laboratorio de Toxicología y Química de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de València, Burjassot, España [mercedes.taroncher@uv.es](mailto:mercedes.taroncher@uv.es)

Algunos cultivos están contaminados de forma natural por *Fusarium*, que producen tricotecnos, un grupo de micotoxinas. La EFSA considera que, debido a la toxicidad tras la exposición alimentaria, existe un riesgo de efectos adversos agudos y crónicos en humanos y animales. La toxina T-2 (T-2) es una de las micotoxinas más comunes

del grupo de los tricotecenos y se encuentra principalmente en avena. La T-2 es el tricoteceno más tóxico. Se le ha relacionado con enfermedades graves como la enfermedad de la leucemia tóxica alimentaria (ATA), un trastorno gastrointestinal y la Enfermedad de Kashin-Beck (KBD), un tipo de osteocondropatía crónica que se distribuía desde el noreste hasta el suroeste de China. A pesar de que los niveles máximos tolerables de la T-2 están legislados en cereales, es necesario evaluar los mecanismos de toxicidad *in vitro* en células humanas a diferentes concentraciones, para conocer mejor el riesgo que supone su ingestión. Se conocen diferentes mecanismos de acción de dicha micotoxina, sin embargo, la ruta metabólica asociadas con los procesos inflamatorios encargada de la generación de interleucinas inflamatorias ha sido poco estudiadas. El objetivo de este estudio fue la cuantificación de la expresión génica a través de qPCR de las interleucinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 en células de hepatocarcinoma humano (HepG2), tras la exposición durante 24 h de 7,5, 15 y 30 nM T-2. Los resultados evidenciaron un aumento de todas las interleucinas de manera concentración dependiente, observándose un aumento significativo con respecto al control de IL-1 $\beta$  a 30 nM (1,65 veces incrementadas), de IL-6 a 15 y 30 nM (2,03 y 2,53 veces incrementadas, respectivamente) y de TNF- $\alpha$  a todas las concentraciones de T-2 (1,60, 2,06 y 5,37 veces incrementadas, respectivamente). Por tanto, podemos concluir que la exposición de la T-2 activa la ruta metabólica inflamatoria en las células HepG2.

**Palabras clave:** T-2 toxin, qPCR, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6

**Agradecimientos:** Ministerio de España de Ciencia e Innovación (PID2020-115871RB-I00), MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033. M. Taroncher agradece al Ministerio de España de Ciencia e Innovación por la beca predoctoral FPI (PRE2021-096941).

### C9) EFECTOS DE ACRILAMIDA, PENITREM A Y 3-ACETYLDEOXYNIVALENOL EN LA PRODUCCIÓN DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS SH-SY5Y

**Bridgeman L**<sup>1</sup>, Moyano-López C<sup>1</sup>, Berrada H<sup>1</sup>, Juan-García A<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Química de los Alimentos y Toxicología, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Valencia, Burjassot, València, España  
[Luna.bridgeman@uv.es](mailto:Luna.bridgeman@uv.es)

Las micotoxinas y la acrilamida (AA) son compuestos tóxicos presentes en alimentos con efectos neurotóxicos asociados. La peroxidación lipídica (LPO) es un proceso implicado en el daño celular, y las células SH-SY5Y son un modelo celular ampliamente utilizado en estudios neurobiológicos. Este estudio se basa en conocer los efectos de AA y dos micotoxinas (Penitrem A (PEN A), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON)) en la producción de malondialdehído (MDA) como indicador de LPO y de estrés oxidativo en células SH-SY5Y, con el objetivo de comprender mejor los mecanismos subyacentes de la neurotoxicidad asociada a estos compuestos. Para ello, las células SH-SY5Y se expusieron a diferentes concentraciones de AA, PEN A y 3-ADON, tanto individualmente como en combinaciones. Se midió la producción de MDA para cuantificar la LPO inducida en cada tratamiento. Los resultados mostraron un aumento dependiente de la concentración en la LPO para el tratamiento individual de AA, PEN A y 3-ADON así como para las combinaciones. La combinación triple produjo un aumento de MDA, para todas las concentraciones ensayadas. Estos resultados resaltan la importancia de considerar las interacciones entre compuestos y los efectos dependientes de la concentración en la modulación del estrés oxidativo.

**Palabras clave:** SH-SY5Y, Acrilamida, Penitrem A, 3-acetyldeoxynivalenol, LPO

**Agradecimientos:** Este trabajo ha contado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación de España PID2020-115871RB-I00, y Conselleria d'Educació, Universitats i Ocupació de los proyectos AICO/2021/037 y CIAICO2022/199 de la Generalitat Valenciana. LB quiere agradecer el programa de becas predoctorales de la Generalitat Valenciana (CIACIF/2021/203).

### C10) PREVALENCIA Y EXPOSICIÓN DE LAS AFLATOXINAS EN CACAHUETES Y ANACARDOS

Blasco J, Berrada H, Rodríguez Y

*Grupo de Investigación Métodos alternativos para determinar efectos tóxicos y evaluación del riesgo de contaminantes y mezclas (RiskTox) Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, Burjassot, 46100, Valencia, España*  
[Joblas6@alumni.uv.es](mailto:Joblas6@alumni.uv.es)

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos hongos que pueden desarrollarse en alimentos y cultivos bajo condiciones específicas, representando un problema global debido a las pérdidas alimentarias y las consecuencias para la salud asociadas con el consumo de alimentos contaminados. En los frutos secos, existe la posibilidad de contaminación fúngica por hongos del género *Aspergillus*, algunos de los cuales tienen la capacidad de producir aflatoxinas durante la cosecha o el almacenamiento. Este estudio, centrado exclusivamente en cacahuetes y anacardos, se llevó a cabo mediante una revisión bibliográfica en la cual se realizó una cuidadosa selección de estudios basada en diversos criterios y, posteriormente, se procedió con el análisis de los datos recopilados. El objetivo principal fue determinar la prevalencia de aflatoxinas en cacahuetes y anacardos en aras de evaluar la exposición a nivel global a través de encuestas de consumo. Los resultados mostraron que el 60% de las muestras de anacardos estaban contaminadas, al igual que el 26% de las muestras de cacahuetes. Además, los cacahuetes contribuyeron a la exposición diaria con valores de hasta 0.48  $\mu\text{g}/\text{día}$  en niños y adolescentes y 0.76  $\mu\text{g}/\text{día}$  en la población adulta. Por otro lado, los anacardos presentaron valores de exposición diaria de hasta 0.16  $\mu\text{g}/\text{día}$  en niños y adolescentes y 0.11  $\mu\text{g}/\text{día}$  en la población adulta.

**Palabras clave:** Micotoxinas; Hongos; Exposición; Aflatoxinas

**Agradecimientos:**

Este trabajo fue financiado por el Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2020-115871RB-I00) y Agencia Estatal de Investigación (AEI/10.13039/501100011033).

**Bibliografía:**

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Seguridad alimentaria. Micotoxinas.. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/micotoxinas.htm).

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Seguridad alimentaria: Guía conjunta EFSA, FAO, OMS para armonizar la evaluación de la exposición de sustancias químicas a través de la dieta. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/noticias\\_efsa/2011/sustancias\\_dieta.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/noticias_efsa/2011/sustancias_dieta.htm).

### C11) OXIDATIVE STRESS RESPONSE OF AZOXYSTROBIN ALONE OR IN COMBINATION WITH DEOXYNIVALENOL

**Rantala S**<sup>1</sup>, Fuentes, C<sup>2,3,4</sup>, Barat, JM<sup>4</sup>, Ruiz, MJ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>University of Eastern Finland

<sup>2</sup>Research Group in Alternative Methods for Determining Toxic Effects and Risk Assessment of Contaminants and Mixtures (RiskTox).

<sup>3</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Valencia, Spain. <sup>4</sup>University Institute of Food Engineering (FoodUPV), Universitat Politècnica de València, Spain

[sofiaran@uef.fi](mailto:sofiaran@uef.fi)

Azoxystrobin is a widely used fungicide in agriculture for which low acute and chronic toxicity to mammals has been described. Deoxynivalenol is a secondary metabolite produced by *Fusarium* species of fungi and the most reported mycotoxin in cereals. Exposure to this mycotoxin through diet has been related to acute and chronic toxic effects, including digestive and immune diseases. Consumers can simultaneously be exposed to pesticides and mycotoxins due to

contamination from food products. However, the toxicological effects of exposure to the mixture of these compounds remain unknown. This study aimed to determine the role of oxidative stress in the toxicity induced by the exposure to azoxystrobin and deoxynivalenol individually and in combination in human hepatocarcinoma (HepG2) cells. For this purpose, three different sublethal concentrations of each compound were used individually and in a binary mixture. Oxidative stress response was determined by measuring reactive oxygen species (ROS) production with the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe, and the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) alterations, with the fluorescent dye Rhodamine 123. The results showed that azoxystrobin and deoxynivalenol increased intracellular ROS generation individually and combined in a time- and concentration-dependent manner. Similarly, exposure to pesticide and mycotoxin, individually or in combination decreased the  $\Delta\Psi_m$  in HepG2 cells at all the concentrations tested. Moreover, the mixture of azoxystrobin and deoxynivalenol produced a higher effect on  $\Delta\Psi_m$  damage than azoxystrobin and deoxynivalenol tested alone. The obtained results demonstrated that both components cause oxidative stress responses in HepG2 cells and that these effects increase when those are part of a mixture. However, more studies are needed to fully understand the molecular mechanism underlying the toxicological interaction of these two toxics.

**Keywords:** Azoxystrobin, deoxynivalenol, mixtures, oxidative stress, HepG2 cells

**Acknowledgments:** This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, grant number PID2020-11587RB-100 MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Cristina Fuentes was supported by a Margarita Salas Postdoctoral Fellowship from Universitat Politècnica de València funded by Ministerio de Universidades and the European Union-NextGeneration EU.

### C12) BIOMONITORING BARIUM IN YOUNG STUDENTS ATTENDING A BRITISH UNIVERSITY ACCORDING TO THEIR BODY WEIGHT AND ETHNIC BACKGROUND

Peña-Fernández A.<sup>1,2</sup>, Higuera M.<sup>3</sup>, Peña MA.<sup>4</sup>, Segura E.<sup>3</sup>, Lobo-Bedmar MC.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK.

<sup>3</sup> Scientific Computation & Technological Innovation Center (SCoTIC), Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

<sup>4</sup> Department of Biomedical Sciences, Universidad de Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Departamento de Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca el Encín, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

[Antonio.penafer@uah.es](mailto:Antonio.penafer@uah.es)

Previously we have detected a certain degree of exposure to barium (Ba) in young university students at De Montfort University (DMU, England). To gain a better idea of the exposure to this contaminant according to body weight and ethnicity, detailed nutrient intake was collected from 111 (20.45 yrs-old; 33 male and 78 female) DMU students from different ethnic backgrounds (41 Asia, 41 Africa, 27 Europe, 1 Central America and 1 Caribbean), using a validated variant of the Nutrition Norfolk Food Frequency Questionnaire. Ba was analysed in scalp-hair provided by 73 of these participants (58 female) by ICP-MS (LoD=0.212 µg/g). Questionnaires were processed with Nutritics software and BMI calculated using height/weight, measured appropriately by a qualified nurse. The levels of Ba were much higher in female participants' hair [ $p$ -value=0.0533; median and range, in µg/g: 2.839 (0.445-210.35) vs. 1.143 (0.364-7.876)] possible due to the differences in the participants according to sex. According to their BMI, 25.7% of the participants monitored had overweight (from 25 to 30 kg/m<sup>2</sup>), meanwhile 9.2% and 8.3% were categorised as individuals

with underweight (<18.5 kg/m<sup>2</sup>) or obesity (>30 kg/m<sup>2</sup>), respectively. Levels of Ba detected did not show statistical differences according to their prevalence of underweight and overweight ( $p$ -value=0.252) after performing a Pairwise Wilcoxon Rank Sum Test. Similarly for ethnic background ( $p$ -value=0.811). The lack of dependence observed might be attributed to the differences in the number of participants for each group. Ba was positively correlated with eggs ( $r=0.2774$ ;  $p<0.05$ ) and meat ( $r=0.4023$ ;  $p<0.01$ ) intake in female counterparts, although the intakes of these food products cannot explain the levels of Ba found in the hair as they were higher in male counterparts. Hair samples were only collected from students that did not use hair dyes before the sampling, so the use of cosmetics and hair dye products cannot also explain the results found. Further studies would be needed to identify potential sources of exposure to this contaminant in the population of Leicester.

**Keywords:** Ba, human hair, dietary intake, university students.

### C13) CHARACTERISING RISKS TO YTTERBIUM IN WILD EDIBLE MUSHROOMS IN LEICESTER, UK.

Peña-Fernández A.<sup>1</sup>, Higuera M.<sup>2</sup>, Sgamma T.<sup>1</sup>, Evans MD.<sup>1</sup>, Lobo-Bedmar M.C.<sup>3</sup>, Peña MA.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK.

<sup>2</sup>Scientific Computation & Technological Innovation Center (SCoTIC), Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain.

<sup>3</sup>Departamento de Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca el Encín, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

[Antonio.penafer@uah.es](mailto:Antonio.penafer@uah.es)

Our group has previously identified that the levels of ytterbium (Yb) in topsoils from Leicester (England) would represent some risks for the population. Twenty-two *Agaricus bitorquis*, a wild edible mushroom, were collected from an open green area close to St Augustine Road, a high traffic area within Leicester. Species identification was confirmed by DNA barcoding. Yb was monitored by ICP-MS in cleaned/dried/homogenised mushrooms [LoD=0.572 ng/g dry weight (dw)] and in composite topsoils samples from four urban parks that surround this road in the Northwest of Leicester (n=25 samples/park), which were processed in duplicates. Organic matter content, pH, electric conductivity and soil textures were also characterised in the topsoils collected. The levels of Yb in *A. bitorquis* (median and range, in ng/g) 0.916 (0.902-7.691), did not show a correlation with the levels found in topsoils [0.720 (0.675-0.814), median value and IQR, in µg/g], and for any of the soil properties/textures determined. Topsoil texture varied between these four parks between loam to silty-loam. Levels of Yb were similar or slightly lower than those described in different wild mushrooms from forests from Belarus and Poland, which might suggest a low contamination of this element in Leicester. Thus, a concentration of 3.5 ng/g dw of Yb was detected in *Sutorius brunneissimus* species collected in an area contaminated with rare earth elements (REE) in Wuham (China). Although the risks to Yb would be negligible in consumers of these wild mushrooms species in Leicester, further monitoring studies would be needed to monitor all REE to better characterise potential risks to humans that incorporate wild mushrooms species in their diets.

**Keywords:** Ytterbium, *Agaricus bitorquis* mushrooms, Leicester, topsoils, risks.

### C14) BIOMONITORING MANGANESE IN AGARICUS BITORQUIS IN LEICESTER, ENGLAND.

Jagdev GS.<sup>1</sup>, Sgamma T.<sup>1</sup>, Lobo-Bedmar MC.<sup>2</sup>, Evans MD.<sup>1</sup>, Peña MA.<sup>3</sup>, Peña-Fernández A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK.

<sup>2</sup>Departamento de Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca el

Encín, Crta. Madrid-Barcelona Km, 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona Km, 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

[Antonio.penafer@uah.es](mailto:Antonio.penafer@uah.es)

Mushrooms can accumulate manganese (Mn) in their tissues, e.g. *Boletus edulis* can take up 6.1-59 mg of Mn/kg dry weight (dw). The aim was to assess the risks to Mn present in wild edible mushrooms *Agaricus bitorquis* collected in Leicester city, England. Twenty-two mushrooms were collected from an open green area close to St Augustine Road, a high traffic area within Leicester. Species identification was confirmed by DNA barcoding using internal transcribed spacer 1/4 primers after extracting DNA from 100 mg of frozen homogenised ground mushroom material using DNeasy Plant Mini Kit<sup>®</sup>. Mn was monitored by ICP-MS in cleaned/dried/homogenised mushrooms [LoD=0.529 mg/kg dw], and in 36 topsoil composite samples collected across the city. Mn was detected in all the samples; median and range in mg/kg dw were: 10.541 (6.877-14.158). The distribution of Mn in mushroom tissues did not show statistical differences (p-value=0.1), although slightly higher levels were found in caps *versus* stipes (data provided as median and ranges in mg/kg dw): 10.541 (6.877-14.158) vs. 9.617 (3.665-17.154). These results agree with the literature reporting higher accumulation of metals in the caps of wild edible mushrooms. Thus, a translocation factor of 1.096 was determined for Mn in the monitored mushrooms. Although the content of Mn in mushrooms would be minimally affected by its presence in topsoils (bioconcentration factor was lower than the unit), the levels monitored in composite topsoil samples [411.012 (253.066-730.977 mg/kg)] were studied. Non-carcinogenic risks quantified for the levels of Mn in topsoils were lower than the threshold suggesting minimal risks to the population. The levels of Mn were much higher than those detected in *Agaricus bisporus* species collected in a natural forest in eastern Poland (5.91 mg/kg dw), suggesting a potential contamination by Mn in the inner city of Leicester.

**Keywords:** *Agaricus bisporus*, mushrooms, biomonitoring, manganese.

#### C15) BIOMONITORING SELENIUM IN YOUNG STUDENTS ATTENDING AN ENGLISH UNIVERSITY.

Peña-Fernández A.<sup>1</sup>, Higuera M.<sup>2</sup>, Segura E.<sup>2</sup>, Lobo-Bedmar MC.<sup>3</sup>, Peña MÁ.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Scientific Computation & Technological Innovation Center (SCoTIC), Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

<sup>3</sup> Departamento de Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca el Encín, Crta. Madrid-Barcelona Km, 38.2, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona Km, 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain  
[Antonio.penafer@uah.es](mailto:Antonio.penafer@uah.es)

Selenium (Se) has been described as a potential antagonist for methylmercury and inorganic Hg. As we reported that De Montfort University (DMU, UK) students overpassed the reference level of Hg in scalp-hair (1 µg/g), the purpose of this study was to assess the dietary intake of Se in this population. Nutrient intake was collected from 111 (18-23 years-old; 78 female) DMU students using a validated Food Frequency Questionnaire, which were processed with Nutritics dietary software. Se was analysed in scalp-hair provided by 73 of the participants (58 female) by ICP-MS (LoD=0.298 µg/g) and processed with NADA statistical package available in R software, owing to the high levels of censored values (94.52%). Thus, Se was only detected in

the hair of four female counterparts (95 percentile=0.301, range=0.298-0.386; all in µg/g). However, the dietary intake of Se was much higher in male participants although without showing statistical significance [p-value=0.0819; data presented as mean and range, all in µg/day: 98.788 (26.846-299.479) vs. 78.269 (21.447-246.713)], which might be attributed to the differences in the number of participants according to sex. These intakes were similar to those reported in 18-64 years-old Spanish individuals (14-265 µg/day), which also found significant higher intakes in male participants. However, the intake of Se was slightly higher than the mean intake reported in general population in the UK (63 µg/day), which might be attributed to differences in the diet owing to the varied students' population according to ethnic background at DMU. However, some DMU participants showed lower intake of Se than the Adequate Intake of 70µg/day set by EFSA for adult men and women. The intake of fish products, which were significantly higher in DMU male participants (16.45 vs. 6.75 g/day, p-value=0.021), could explain the differences found; thus, a strong positive correlation was found between Se and fish (r=0.473, p<0.001).

**Keywords:** Se, human hair, dietary exposure, university students.

#### C16) IMPLEMENTING UK TECHNICAL GUIDANCE TO RESPOND TO CBRN EVENTS AFFECTING FOOD PRODUCTION SYSTEMS AT THE UNIVERSITY OF ALCALÁ

Peña-Fernández A.<sup>1</sup>, Wyke S.<sup>2</sup>, Duarte-Davidson R.<sup>2</sup>, Peña MÁ.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; <sup>2</sup> UK Health Security Agency (UKSHA), Centre for Radiation, Chemical and Environmental Hazards, Didcot, OX11 0RQ; <sup>3</sup> Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona Km, 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.  
[Antonio.penafer@uah.es](mailto:Antonio.penafer@uah.es)

Following global chemical, biological, radiological and nuclear (CBRN) health threats, such as the on-going wars in Ukraine and Israel-Gaza, we have updated our CBRN training course and introduced it at different undergraduate (MPhar Pharmacy, BSc Environmental Sciences, BSc Criminalistics: Sciences and Forensic Technologies) and postgraduate (MSc Industrial Pharmacy and Galenics) programmes at University of Alcalá, Spain, in 2023/24. The updates included the incorporation of different practical workshops based on real chemical and biological events affecting food production systems. Students used the UK Health Security Agency (UKSHA)'s UK Recovery Handbooks for Chemical (UKRHCI) and Biological Incidents (UKRHBI), and their associated tools, to respond to each scenario. Each handbook presents recovery options (ROs) or actions intended to reduce exposure of humans and the environment to CB substances. ROs are selected based on the physicochemical/physiological characteristics of the agent(s) involved and the characteristics of the site. Results collected to date include data from two undergraduate programmes and the MSc, showed similar results despite the different curriculums/background of students across these programmes. Most students indicated that were able to follow the lectures and workshops easily/well despite the UKSHA's guidance (UKRHCI and UKRHBI) and associated tool (Chemical Recovery Record Form, CRRF) are only available in English. Students worked in mini-teams to deliver their recovery interventions in two specific workshops: a) chemical: to manage freshwater and marine fish and shellfish affected by pharmaceuticals and cosmetics; and b) biological: to decontaminate crops (rice, wheat, corn, fruits and vegetables, both in the field and post-harvest) contaminated with protozoan human pathogens. Mini-teams were successful in selecting appropriate/relevant ROs for each scenario, suggesting the relevance of our training to teach CB response in students from different backgrounds and courses/specialities. Further developments include an analysis on the effect of the course in the deep learning of CBRN topics.  
**Keywords:** CBRN training, CBRN response, environmental decontamination, food production systems, guidance.

#### C17) APPLICABLE DECONTAMINATING TECHNIQUES FOR

### HUMAN-PATHOGENIC FREE-LIVING AMOEBAS IN WATER SYSTEMS IN BOMBALI DISTRICT (SIERRA LEONE)

Anjum U.<sup>1</sup>, Peña MÁ.<sup>2</sup>, Guetiya Wadoum RE.<sup>3</sup>, Peña-Fernández A.<sup>1,4</sup>  
<sup>1</sup>Leicester School of Allied Health Sciences, De Montfort University, Leicester, LE1 9BH, UK; <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona Km, 33.6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Department of Public Health, Ernest Bai Koroma University of Science and Technology, Makeni, Sierra Leone; <sup>4</sup>Department of Surgery, Medical and Social Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona, Km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

[Antonio.penafer@uah.es](mailto:Antonio.penafer@uah.es)

*Acanthamoeba* spp. and *Naegleria fowleri* are human-pathogenic free-living amoebas (FLA) that have been included on the Contaminant Candidate List of the US Environmental Protection Agency because their trophozoites/cysts are resistant to harsh environmental conditions and can act as reservoir for different virulent human pathogens. The elimination of FLA from water systems is also difficult since they are resistant to various disinfectants, among which are those commonly used to treat drinking water. Previously, we have detected the presence of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from wells, ponds and rivers from Bombali District (Sierra Leone), suggesting a wide environmental distribution of these FLA species that could threaten drinking water systems, representing a serious health concern. We have used the UK Recovery Handbook for Biological Incidents (UKRHBI) available at the UK Health Security Agency website to identify applicable recovery options (ROs) to reduce the presence of FLA in water systems in SL. The UKRHBI provides a pool of ROs for the protection, decontamination and fate of affected produce specifically designed for three types of environments, including water systems. Applicable ROs selected based on the physiological characteristics of FLA included: restrict water use and use of bottled water when possible for drinking purposes; removal of contamination source and/or modification of existing water treatment (e.g. development of water treatment plants that can use ozone), and treatment of sludge (use of ultrasonic disintegration treatment and top-soil stabilisation treatment). Emerging evidence suggests that photolysis of sodium chloride (NaCl) and sodium hypochlorite (NaOCl) in the water could inactivate trophozoites or cysts of *Acanthamoeba castellanii*, technology that could be adopted to inactivate these FLA species and other chlorine-resistant pathogens. Sierra Leonean authorities could implement some of these interventions easily to protect children, the elderly, immunocompromised individuals, and Ebola survivors, to reduce the high mortality rates recorded in SL.

**Keywords:** free-living amoebas, *Acanthamoeba* spp., tap water, human risks, disinfection, environmental decontamination.

### C18) DETERMINACIÓN Y EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ELEMENTOS EN PRODUCTOS COMERCIALES DE ARROZ CONSUMIDOS EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

Boluda R, Fernández-Gómez E, Andreu-Sánchez O, Blancato G, Roca-Pérez L

Av Vicent Andrés i Estellés s/n, 46100 Burjassot (Universitat de València, Facultat de Farmàcia, Dept. Biologia Vegetal)

[boluda@uv.es](mailto:boluda@uv.es)

El arroz es uno de los cereales más consumidos en el mundo. La Asamblea General de las Naciones Unidas declaró el 2004 Año Internacional del Arroz, con el fin de centrar la atención sobre este cultivo y su seguridad alimentaria para contribuir a paliar el hambre a nivel mundial. Debido a prácticas agrícolas inadecuadas o a la presión antrópica, ha habido casos de contaminación que han provocado problemas ecotoxicológicos. Su calidad, las diferencias nutricionales entre las distintas áreas productoras o el efecto del tipo de agricultura son motivo de estudio. El objetivo de este trabajo fue determinar y comparar el contenido de los siguientes elementos: macronutrientes

(Ca, K, Mg, P y S), micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni y Zn), peligrosos (As, Cd, Cr y Pb) y otros (Al, Co, Li, Rb, Sb, Sr, Ti, Tl, V) en diferentes tipos de arroz producidos o comercializados y consumidos en la Comunidad Valenciana. Para ello, se llevó a cabo un muestreo aleatorio en supermercados, comercios y cooperativas. Las muestras de arroz fueron trituradas y tamizadas. Se llevó a cabo una digestión ácida asistida por horno microondas para posteriormente determinar los diferentes elementos en el digerido mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). En general, los niveles de los elementos analizados se encuentran dentro de los rangos indicados en la bibliografía. No obstante, hay que destacar el caso del Pb que se detectó en el 68% de las muestras, de las cuales el 62% presentaron valores superiores a los niveles indicados por la legislación (0,20 mg/kg; Reglamento UE 2023/915) A excepción de B, S y Pb, el resto de los elementos estuvieron en mayor concentración en el arroz integral. No se obtuvieron diferencias significativas entre el arroz integral ecológico y el convencional en la mayoría de los elementos.

**Palabras clave:** alimentos, metales, agricultura ecológica, agricultura convencional

### C19) ROLE OF PUMPKIN AND FERMENTED WHEY IN AFB1 AND OTA RESIDUES IN LIVER TISSUES USING ULTRA-HIGH LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ORBITRAP HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Cimbalo A.<sup>1</sup>, Lima da Silva J.<sup>3</sup>, Izzo L.<sup>2</sup>, Manyes L.<sup>1</sup>, Ritieni A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, Burjassot, 46100 Valencia, Spain;

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131 Naples, Italy

<sup>3</sup>Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande—FURG, Av Itália, km 8, Rio Grande, RS 96201-900, Brazil;

[alessandra.cimbalo@uv.es](mailto:alessandra.cimbalo@uv.es)

Understanding and controlling human and animal exposure to aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) is nowadays a major concern for food safety. In fact, these toxins are absorbed in the intestinal tract, reach the bloodstream, bioaccumulate in the organs and tissues or be excreted in biological fluids or faeces. For this purpose, this study aimed to develop and validate an analytical methodology for the determination of AFB1 and OTA residues in liver using ultra-high liquid chromatography with orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). Moreover, to evaluate the reduction of mycotoxins bioaccumulation after the administration of pumpkin and fermented whey. Method validation was carried out by using chicken liver as a blank matrix. Mycotoxin analysis was initiated by using a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS)-based method employing acetonitrile as extractor solvent. The validation was performed by analyzing recovery samples at four different spiked concentrations, 5, 10, 25 and 50 ng/mL, with three replicates ( $n=3$ ) at each concentration. Twelve concentration levels were used for constructing the calibration curves which showed good linearity between LOQ and 100 times LOQ concentration levels (linear range). The matrix effect was evaluated and matrix-matched calibrations were used for quantification. Limits of quantitation for AFB1 and OTA were, respectively, 0.78 and 6.25 ng/mL. Recovery rates were up to 70% for both mycotoxins. Subsequently, the method validated was applied to experimental liver samples to detect the concentration of mycotoxins bioaccumulated in hepatic tissues. On the one hand, daily intakes for group exposed to mycotoxins ranged between 174.83  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  and 210.46  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for AFB1; 281.46 and 564.76  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for OTA. When adding the functional ingredients, concentrations were from 178.74 to 380.26  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for AFB1 and 220.97 to 640.79  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for OTA. On the other hand, mycotoxins residues in liver of the rats fed with functional ingredients presented until a 100% of reduction for AFB1 and until an 80% for OTA.

**Keywords:** Aflatoxin B1, Ochratoxin A, QuEChERS, bioaccumulation, UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

**C20) EFECTOS PROTECTORES DEL SULFORAFANO FRENTE A SUSTANCIAS TÓXICAS Y CONTAMINANTES****Cascajosa-Lira A, Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Cameán AM***Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España.*[aclira@us.es](mailto:aclira@us.es)

El sulforafano (SFN) es un isotiocianato dietético, derivado de la glucorafanina, presente en las verduras crucíferas pertenecientes al género *Brassica*. Es un fitoquímico biológicamente activo. Así pues, se le atribuyen múltiples funciones beneficiosas frente a diversas patologías, entre ellas respuestas anticancerígenas y de protección frente a la acción de agentes tóxicos. El objetivo de esta revisión fue establecer el prometedor uso del SFN como compuesto quimioprotector recopilando sus efectos beneficiosos observados tanto en estudios experimentales *in vitro* como *in vivo*, considerando diferentes órganos y/o células diana y la diversidad de sustancias químicas cuyos efectos puede contrarrestar. Esta revisión bibliográfica se llevó a cabo teniendo en cuenta publicaciones desde el año 2000 hasta la actualidad. Los resultados mostraron que el hígado y el sistema nervioso son los órganos diana que centraron la atención, y esto podría deberse al papel clave del estrés oxidativo en las enfermedades hepáticas y neurodegenerativas. El principal mecanismo de acción del SFN para contrarrestar la acción tóxica de los xenobióticos implica la activación del factor nuclear Nrf2, convirtiéndolo en un antioxidante indirecto. Además, se destacan sus efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y su capacidad para regular el metabolismo. A pesar de que se ha evidenciado su impacto protector en órganos como el riñón, el tracto gastrointestinal y la piel, entre otros, se requieren estudios adicionales para profundizar en la posible aplicación terapéutica del SFN en la salud humana.

**Palabras clave:** Seguridad alimentaria, *in vitro*, *in vivo*, Compuestos organosulfurados, Brócoli.

**Agradecimientos:** Junta de Andalucía por la financiación económica (Proyecto P18-TP-2147). Antonio Cascajosa Lira agradece al Ministerio de Universidades español por financiar la beca FPU (FPU2019-01247).

**C21) HEAVY METAL BIOACCUMULATION IN EDIBLE MUSHROOMS: INFLUENCE OF GROWING CONDITIONS****Calleja-Gómez M<sup>1</sup>, Pallarés N<sup>1</sup>, Barba FJ<sup>1</sup>, Berrada H<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> *Research Group in Innovative Technologies for Sustainable Food (ALISOST),*<sup>2</sup> *Grupo de Investigación Métodos alternativos para determinar efectos tóxicos y evaluación del riesgo de contaminantes y mezclas (RiskTox) Preventive Medicine and Public Health, Food Science, Toxicology and Forensic Medicine Department, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Spain.*[Mara.calleja@uv.es](mailto:Mara.calleja@uv.es)

Mushrooms are considered a food with a good nutritional profile, low in fat and rich in bioactive compounds. However, they are excellent bioaccumulators of heavy metals present in cultivated soils and their affinity for individual heavy metals depends on the fungal species. To determine the heavy metal content, samples of the mushrooms *A. bisporus*, *A. brunnescens*, *P. ostreatus*, *L. edodes* and *L. deliciosus* (wild) were taken and analyzed for the content of Cd, Hb, As and Pb using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), determining the amount of heavy metals per 100 g of fresh product. Pulsed electric field (PEF) extraction was performed on *L. deliciosus* to see how the extraction affected the wild mushroom. The results showed that *A. bisporus* had a high Pb content (16.50 µg/100g) and *L. edodes* and *L. deliciosus* were abundant in arsenic, the latter with 44 µg/100g, due to the conditions of the substrate in Villafranca del Cid, Castellón, Comunitat Valenciana, Spain. Therefore, these results are crucial to assess the risks associated with consumption and to establish safe maximum intake levels, also considering the growing conditions such as soil composition, geographical location and water quality used.

**Keywords:** arsenic; heavy metal; mushroom; bioaccumulation

**Acknowledgments:** This research has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2021-123628OB-C42 - Eco-innovative extraction of nutrients and bioactive compounds from agro-food co-products for the design of healthier foods. Study of biological activities), funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and FEDER, EU. Mara Calleja-Gómez is beneficiary of a doctoral scholarship from the Conselleria d'Educació, Universitats i Ocupació de la Generalitat Valenciana (CIACIF/2022/391).

**C22) EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN CEREBRO DE RATAS EXPUESTAS ORALMENTE A CILINDROSPERMOPSINA****Plata-Calzado C, Prieto AI, Cameán AM, Jos A***Área de Toxicología, Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla) España.*[cpcalzado@us.es](mailto:cpcalzado@us.es)

La cilindrospermopsina (CYN) es una cianotoxina con distribución mundial que suscita preocupación debido a sus efectos tóxicos. Entre las vías de exposición a CYN destaca la vía oral a través del consumo de agua y alimentos contaminados. Sus efectos tóxicos incluyen daños hepáticos, gastrointestinales, renales y neurotóxicos entre otros. No obstante, los estudios que evalúan los efectos neurotóxicos de CYN en modelos *in vivo* son limitados. Por ello, el objetivo de este estudio fue la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en cerebro de ratas Wistar macho expuestas oralmente a CYN pura (7,5, 23,7 y 75 µg/kg peso corporal). La CYN fue administrada por sonda nasogástrica a los animales a las 0, 24 y 45 h y sacrificados 3 h después de la administración de la última dosis. Se midieron los niveles de peroxidación lipídica (LPO), la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Los resultados mostraron incrementos dosis-dependientes en los niveles de LPO y un aumento significativo de las actividades de las enzimas SOD y CAT en las ratas expuestas sólo a la mayor dosis de CYN (75 µg/kg). Sin embargo, ningún cambio fue observado en los niveles de GSH y GSSG de ratas expuestas a CYN con respecto al grupo control. Estos hallazgos sugieren que CYN podría causar efectos neurotóxicos en ratas tras exposición oral y subrayan la necesidad de realizar más estudios que exploren el perfil toxicológico de CYN a nivel cerebral con el fin de prevenir el riesgo potencial asociado a la exposición a CYN.

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-104890RB-I00 MICIN/AEI/10.13039/501100011033) Cristina Plata-Calzado agradece a la Junta de Andalucía su beca predoctoral (contrato PREDOC\_00447).

**Palabras clave:** cilindrospermopsina, *in vivo*, estrés oxidativo, neurotoxicidad

**C23) Evaluating the minerals and heavy metal contaminants in SFE extracts obtained from the Salmon side streams.****Liu Y<sup>1</sup>, Castagnini J M<sup>1</sup>, Barba F J<sup>1</sup>, Berrada H<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> *Research group in Innovative Technologies for Sustainable Food (ALISOST)*<sup>2</sup> *Alternative methods for the determination of toxic effects and risk assessment of contaminants and mixtures (RISKTOX)**Department of Preventive Medicine and Public Health, Food Science, Toxicology and Forensic Medicine, Faculty of Pharmacy and Food Sciences. Burjassot. Spain*[Yiliu2@alumni.uv.es](mailto:Yiliu2@alumni.uv.es)

Atlantic salmon (*Salmo salar*) is well-known as a commercial fish exceptionally rich in bioactive compounds. Conversely, head, backbone, and viscera labelled as salmon by-products generated in the food industry have been traditionally discarded wondering of the parameters of food safety and the quality of this side stream nutrients. Conventional extraction techniques usually include hazardous organic solvent utilisation which transforms the supercritical fluid extraction with properties of both liquids and gases an attractive environment-friendly technique to explore with green solvents. Supercritical Fluid

Extraction (SFE) is run with ethanol to obtain lipid liquid extracts but our interest is also extended to solid matrix to characterize heavy metals and minerals after SFE extraction. The minerals containing magnesium (Mg), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), Fe, and zinc (Zn) were investigated in both solid matrices and oil extracts from salmon side streams using SFE and SE methods, and the arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) has been explored for the food safety profile. All the results of mineral and heavy for solid matrices and oil extracts were under the maximum permitted levels. The data suggesting the solid matrices and oil extracts obtained from the salmon side streams can serve as edible ingredients, which can further exploration and utilization as a function of food. The recovery of these compounds constitutes a key point for the variation of by-products, with the possibility of creating the utilization in the formulation of food and cosmetic products. Considering the no toxicity of oil extracts and solid matrices obtained from the salmon side streams, it can be used as functional food ingredients for food sustainability.

**Keywords:** SFE; SE; salmon side streams; mineral; heavy metal

**Acknowledgements:** Yixuan Liu was supported by a Ph.D. fellowship from the China Scholarship Council (CSC) (No. 202208420013). This research has been funded by BBI-JU through the H2020 project AQUABIOPRO-FIT “Aquaculture and agriculture biomass side stream proteins and bioactives for feed, fitness, and health promoting nutritional supplements” (Grant number 790956).

**Bibliography :** Wang, M., Zhou, J., Pallarés, N., Castagnini, J. M., Carmen Collado, M., & Barba, F. J. (2023). Evaluation of heavy metals, mycotoxins and mineral bioaccessibility through in vitro static digestion models of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sole (Dover sole) side stream extracts obtained by pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, 419, 136054.

validez de los mismos, su aplicación práctica y las directrices para nuevas investigaciones.

*\*Los apartados de resultados y discusión pueden redactarse conjuntamente.*

**Conclusiones.** Breves obtenidas directamente del trabajo.

**Agradecimientos.** Si fueran necesarios, particularmente a las entidades financiadoras.

**Bibliografía.** La exactitud de las referencias bibliográficas es responsabilidad de los autores. Sólo deberían incluirse referencias relacionadas estrechamente con el trabajo. Todas las referencias listadas deben ir citadas en el texto.

Las referencias bibliográficas se referencian en el texto con el apellido del autor y año de publicación si el autor de la obra es uno solo (Font, 2005). En caso de ser dos los autores de la publicación se citarán los apellidos de ambos (Font y Ruiz, 2009). Si son tres o más los autores se pondrá el apellido del primer autor et al., año (Tolosa et al., 2013). Las referencias a distintos trabajos en una misma cita se separan con punto y coma y son ordenadas cronológicamente: (Rodríguez et al., 2012; Serrano et al., 2013). Si existieran varias referencias de un autor/es o autora/s en un mismo año se consignarán con las letras a, b, c, etc., después del año.

En el apartado de bibliografía se recogen todas las referencias por orden alfabético y del modo indicado a continuación. La bibliografía irá citada de la siguiente forma:

#### 1. Artículos de revistas.-

Estructura general: Autor/es. Título del artículo. Abreviatura internacional de la revista. Año; volumen (número), página inicial-final del artículo.

Ejemplo: Tolosa J, Font G, Mañes J, Ferrer E. Presencia de micotoxinas Fusarium en pescado de acuicultura. Rev. Toxicol. 2013; 30 (2), 193-197.

#### 2. Libros y otras monografías.-

Estructura general: Autor/es. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. La primera edición no es necesario consignarla. La edición siempre se pone en números arábigos y abreviatura: 2ª ed. Si la obra estuviera compuesta por más de un volumen, debemos citarlo a continuación del título del libro: Vol. 3.

*-Capítulo de libro.*

Autor/es del capítulo. Título del capítulo. En: Director/Coordinador/Editor del libro. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial; año. Página inicial-final del capítulo.

Ejemplo: Cameán AM, Repetto M. Introducción y conceptos. En Cameán AM, Repetto, M. (Eds.), Toxicología alimentaria. Díaz De Santos, Madrid, España. 2006. p.1-18.

*-Comunicación presentada a un congreso.*

Autor/es de la Comunicación/Ponencia. Título de la Comunicación/Ponencia. Título oficial del Congreso. Publicación. Editorial; año. Página inicial-final de la comunicación/ponencia.

Ejemplo: Saladino, F., López, M., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., Meca, G. El uso de antimicrobianos naturales para el aumento de la vida útil del pan de molde. XXICongreso Español y V Iberoamericano de Toxicología. Rev. Toxicol. 32 (1). Asociación Española de Toxicología; 2015, p32.

#### 3. Material electrónico.- Artículo de revista en Internet.

Autor/es del artículo. Título del artículo. Nombre de la revista [revista en Internet] año [fecha de consulta]; volumen (número): [Extensión/páginas]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Francés I, Barandiarán M, Marcellán T, Moreno L. Estimulación psicocognoscitiva en las demencias. An Sist Sanit Navar [revista en Internet] 2003 septiembre-diciembre. [Acceso 19 de octubre de 2005]; 26(3). Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol26/n3/revis2a.html>

*-Monografía en Internet.*

Autor/es o Director/Coordinador/Editor. Título [monografía en Internet]. Edición. Lugar de publicación: Editor; año [fecha de consulta]. Dirección electrónica.

Revista de

# Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Los manuscritos, **en español o inglés**, se someterán por el editor a dos expertos que actuarán como revisores externos a la revista, cuyas observaciones se trasladarán al autor para la reescritura del original en caso de ser aceptados.

El texto debe ser claro y conciso, cuidando la ortografía y la utilización de abreviaturas (SI). Tanto la forma como el contenido deberán ser cuidadosamente revisados antes de su envío. Se utilizará **interlineado a doble espacio, letra tipo Times New Roman de 12 puntos, sin sangrías en los párrafos, con justificación completa**, con márgenes amplios, en tamaño DIN A4, preferiblemente en archivo Word. Todas las páginas irán numeradas correlativamente.

Manuscritos en **español**: Título, Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es, Institución/es, Resumen, Palabras Clave, Title, Abstract, Key Words, Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Bibliografía, Tablas, Leyendas de las Figuras.

Manuscritos en **inglés**: Title, Family name/s and First name/s initial/s, Abstract, Key Words, Título, Resumen, Palabras Clave, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Leyends of figures.

El manuscrito se estructura, por tanto, en los siguientes apartados (por favor, no use mayúsculas más que en la primera letra del título y apartados):

**Título** descriptivo del artículo (no en mayúsculas) y **Title**, además de una versión corta del título.

**Apellido/s e inicial/es** del nombre del autor/es.

**Institución/es** donde se ha realizado el trabajo, distinguiéndolas con numerales en superíndice. Marcar con un asterisco el autor de contacto e incluir su correo electrónico, teléfono y fax.

**Resumen y Abstract.** Las versiones en español e inglés serán lo más informativas posible, en un solo párrafo, con una pequeña introducción, la identificación de los métodos, los resultados abreviados y particularmente las conclusiones del trabajo. Su lectura dará una idea clara del mismo. Ninguno debe sobrepasar las **250** palabras ni incluir abreviaturas, referencias o tablas.

**Palabras Clave y Key Words** tras cada resumen, con hasta cinco palabras separadas por punto y coma.

**Introducción:** descripción de los orígenes y bases del estudio.

**Material y Métodos.** Se evitarán descripciones de todo aquello que pueda encontrarse en la bibliografía citada. Deben describirse de forma concisa los individuos y series estudiados, criterios de selección, procedimientos, duración y número de repeticiones de los ensayos, equipo y materiales utilizados y cuantos datos puedan precisarse para la repetición del estudio. Deben especificarse las técnicas analíticas y los métodos estadísticos. Para sustancias químicas o fármacos se citará el nombre genérico conforme a la IUPAC. Si se utiliza una marca registrada, se hará constar el nombre genérico y el nombre del fabricante.

**Resultados.** Se presentarán las observaciones realizadas, sin interpretarlas, así como el análisis estadístico. Los datos numéricos se pueden presentar en tablas o figuras, pero sin repetirlos entonces en el texto.

**Discusión:** en ella se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, las razones que apoyan la

Ejemplo: Moraga Llop FA. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Dermatología Pediátrica. [Monografía en Internet]. Madrid: Asociación Española de Pediatría; 2003 [acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: Autor/es. Título [sede Web]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización; fecha de acceso]. Dirección electrónica.

Ejemplo: Fisterra.com, Atención Primaria en la Red [sede Web]. La Coruña: Fisterra.com; 1990- [actualizada el 3 de enero de 2006; acceso 12 de enero de 2006]. Disponible en: <http://www.fisterra.com>

-Parte de una página de un sitio o sede Web.

Título de la página [sede Web]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [fecha de actualización/revisión; fecha de acceso]. Título de la sección [número de páginas o pantallas]. Dirección electrónica.

Ejemplo: American Medical Association [sede Web]. Chicago: The Association; c1995- 2002 [actualizado 5 de diciembre de 2005; acceso 19 de diciembre de 2005]. AMA Office of Group Practice Liaison; [aproximadamente 2 pantallas]. Disponible en: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>.

-Base de datos en Internet.

Institución/Autor. Título [base de datos en Internet]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de creación, [fecha de actualización; fecha de consulta]. Dirección electrónica.

Ejemplo: PubMed [base de datos en Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 1966- [fecha de acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

-Parte de una base de datos en Internet. MeSH Browser [base de datos en Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 [acceso 19 de diciembre de 2005]. Meta-analysis; unique ID D015201 [aproximadamente 3 pantallas]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>. Ficheros actualizados semanalmente.

Para otras situaciones no recogidas en este texto se puede consultar la siguiente dirección <http://www.fisterra.com/herramientas/recursos/vancouver/#ejemplos>

## Tablas

1. Deben ser tan claras y simples como sea posible.
2. Las tablas se incluyen **tras la bibliografía**, en el documento principal del manuscrito, en páginas independientes, numeradas correlativamente (1, 2...).
3. Los títulos deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin consultar el texto.
4. La información adicional puede incluirse como nota al pie de tabla o figura.
5. Las tablas debieran ser lo suficientemente cortas para evitar dividir las.

<http://www.aeped.es/protocolos/dermatologia/index.htm>

-Sede Web o Página principal de inicio de un sitio Web.

## Figuras

- Los pies de las figuras se incluyen en el documento principal del manuscrito, tras las tablas, numerados consecutivamente (1, 2...) y deben ser lo suficientemente descriptivos como para hacerlos comprensibles sin necesidad de consultar el texto.
- Las figuras propiamente dichas se envían **comprimidas en formato WinZip**. Las imágenes se enviarán digitalizadas, preferiblemente en formato TIFF, JPEG o PNG de al menos 300 p.p.p.de resolución (pero no mucho más) para el tamaño final.
- **Dado que actualmente la revista únicamente se edita en versión digital, las figuras deberán enviarse en color**. Los símbolos identificadores preferidos en las figuras son círculo, cuadrado y triángulo abiertos o llenos.
- Las figuras deben tener suficiente calidad. **No contendrán los títulos ni referencia a su número ni tendrán innecesariamente espacio en blanco alrededor**.
- Las señales y leyendas se pueden incluir dentro de los ejes de la figura.
- Las figuras publicadas previamente deben contar con el permiso escrito del titular de los derechos.

La redacción de la revista se reserva el derecho de introducir modificaciones en los artículos recibidos, siempre que no alteren el sentido de los mismos, para adaptarlos al estilo de la revista.

**Los trabajos se enviarán a través de la plataforma de la revista: <http://rev.aetox.es/wp/index.php/envio-articulo/>**

**El Equipo Editorial: [revista@aetox.es](mailto:revista@aetox.es)**

### Editora jefe:

Dra. Emilia Ferrer García. Universitat de València.  
Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal.  
Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot. Valencia

### Editora adjunta:

M<sup>a</sup> del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura. Spain.

### Editor asociado:

Dr. Juan Carlos Rios Bustamante. Pontificia Universidad Católica de Chile



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA  
Rev. Toxicol. 41 (2), 68-136 (2024)  
ISSN 0212-7113

# Asociación Española de Toxicología

- Presidenta:** Dra. M<sup>a</sup> José Ruiz Leal  
Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia
- Vicepresidenta:** Dra. Ángeles Jos Gallego.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
- Secretaria:** Dr. Nahúm Ayala Soldado  
Facultat de Veterinaria. Universitat de Córdoba.
- Tesorera:** Dra. Emma Martínez López.  
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
- Internet:** <http://aetox.es>

## *Sección de Educación en Toxicología*

Dra. Silvia Pichardo Sánchez  
Universitat de Sevilla.

## *Sección de Métodos Alternativos*

Dr. Rafael Balaña Fouce  
Universidad de León.

## *Sección de Seguridad Alimentaria*

Dra. Houda Berrada Ramdani  
Universidad de Valencia.

## *Sección de Toxicología Ambiental*

Dr. David Hernández Moreno  
Instituto Nacional de Investigación y  
Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-  
CSIC)

## *Sección de Toxicología Clínica*

Dra. Ana Isabel Morales Martín  
Universidad de Salamanca.

## *Sección de Toxicología Experimental*

Dr. Antonio Lora Benítez  
Universidad de Córdoba.

## *Sección de Toxicología Forense*

Dra. Pamela Cabarcos Fernández  
Universidad de Santiago de Compostela.

## *Sección de Toxicología Veterinaria*

Dr. Marcos Pérez López  
Universidad de Extremadura.

## *Revista de Toxicología (Editada desde 1983)*

**Editora jefe:**

Dra. Emilia Ferrer García  
Universitat de València.

**Editora adjunta:**

Dra. M<sup>a</sup> del Prado Míguez Santiyán.  
Universidad de Extremadura.

**Editor adjunto:**

Dr. Juan Carlos Rios Bustamante  
Pontificia Universidad Católica de Chile

**E-mail equipo Editorial:** [revista@aetox.es](mailto:revista@aetox.es)