# NOCIONES Y PLANTEAMIENTOS TOXICOLÓGICOS EN LA PRESERVACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO.

M.C. Riva *)

**0.1 Resumen.**

En este artículo se pretende dar a conocer las principales nociones y planteamientos básicos de la especialidad toxicológica como soporte a las distintas áreas de la industria, en la preservación del medio ambiente. Se citan por último algunas especies de organismos acuáticos, utilizadas en nuestro Centro en los ensayos de toxicidad, siguiendo la metodología de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE).

**0.2 Summary.** *BASIC ECOTOXICOLOGICAL PROTOCOL TO ASSESS THE AQUATIC ENVIRONMENTAL RISK.*

A basic protocol about ecotoxicology and a revision of the data required to assess the risk of chemicals in the environment is presented in this paper. The most frequent aquatic biotests carried out in our laboratory following the OECD regulations, are indicated.

**0.3 Résumé.** *PRINCIPES BASIQUES TOXICOLOGIQUES POUR LA PRESERVATION DE L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.*

Dans ce travail on traite les principes basiques de la toxicologie au service des differentes branches de l'industrie, pour la preservation de l'environnement. On présente aussi les organismes aquatiques les plus utilisées pour les tests biologiques, dans notre laboratoire, en suivant la metodologie de la OCDE.

*) Dra. Ciencias Biológicas Mª del Carmen Riva Juan. Laboratorio de "Control de la Contaminación Ambiental" de este Instituto. Investigador de la U.P.C.

## 1. INTRODUCCIÓN

Como protección del medio ambiente hay que entender la preservación de las aguas, del suelo y del aire así como de los seres vivos que en ellos se hallan, frente a los posibles daños producidos por emisiones en la fabricación de productos o por la presencia de los mismos en las aguas residuales, en los resíduos sólidos y en el aire residual.

La Directiva 79/831/EEC, de la Comunidad Económica Europea en su sexta disposición, especifica ciertos requisitos que toda sustancia debe cumplir en vistas a ser comercializada. El objetivo de esta notificación es estandarizar la extensa información y las pruebas necesarias a que deben de someterse las sustancias químicas. A partir de 1981 dicha disposición sexta gana fuerza, y en ese mismo período se notifican aproximadamente unas 200 nuevas sustancias, creándose a continuación la "The Notification of New Substances Regulations 1982" que exige un conocimiento adecuado sobre las nuevas sustancias antes de entrar en el Mercado Comunitario Europeo. La información debe de ser suficiente en cantidad y en calidad y que permita la determinación del impacto del compuesto químico en el ambiente. Para ello son necesarios distintos datos (Hobbs, 1989; Fairhurst, 1989; Hardt, 1990) relacionados con el uso, las descargas o los vertidos al medio y el comportamiento del nuevo compuesto. En la siguiente tabla se presenta una lista de algunos de los parámetros que hay que aportar.

**TABLA 1**
**Datos a notificar**

Identidad de la sustancia

- Nombre (s), Nombre comercial, Fórmula empírica y estructural.
- Composición: grado de pureza, naturaleza de las impurezas, datos espectrales.
- Métodos de detección y determinación.

Información de la sustancia

- Utilización: tipos (función de la sustancia y efectos deseados) y campo de aplicación (industria, granjas, comercio, público en general).
- Producción estimada y/o importada del orden de toneladas/año: 1, 10, 50, 100, 1000, 5000, etc.
- Métodos recomendados y precauciones relacionadas con el manejo, almacenamiento, transporte, fuego y otros peligros.
- Medidas de emergencia.

Propiedades físico-químicas de la sustancia

- Punto de fusión
- Punto de ebullición
- Densidad relativa
- Presión de vapor
- Tensión superficial
- Solubilidad en agua
- Solubilidad en lípido
- Coeficiente de reparto n-octanol/agua (log Pow)
- Inflamabilidad
- Propiedades explosivas
- Anti-inflamabilidad
- Propiedades oxidantes

Estudios Ecotoxicológicos

- Toxicidad aguda para los peces - CL50
  - No efecto de la concentración
- Toxicidad aguda para Daphnia - CL50
  - No efecto de la concentración
- Degradación- Biodegradabilidad
- Degradación abiótica (hidrólisis en función del pH)
- DBO
- DQO
- DBO/DQO

Estudios toxicológicos

- Toxicidad aguda oral
- Toxicidad aguda dérmica
- Toxicidad aguda por inhalación
- Irritación epidérmica
- Irritación ocular
- Sensibilización epidérmica
- Toxicidad subaguda (28 días) - oral
- Toxicidad subaguda (28 días) - dérmica
- Toxicidad subaguda (28 días) - inhalación
- Toxicidad in vitro - ensayo de mutacion bacteriana
- Toxicidad in vitro o in vivo - ensayo de daños cromosómicos

Como puede desprenderse de la Tabla 1, son muy importantes las valoraciones toxicológicas, estando los ensayos a realizar relacionados con los tipos de compuestos o famílias químicas y con el uso al que van destinados.

La industria química en general y concretamente la industria textil ha comenzado desde hace tiempo a sensibilizarse de manera que junto a los aspectos puramente técnicos y económicos, van adquiriendo mayor significado los puntos de vista ecológicos (Rosenthal, 1990). Empresas productoras, fabricantes y consumidores se enfrentan a los riesgos de los productos tanto para el hombre como para el medio ambiente. Las empresas de productos químicos editan las hojas de datos de seguridad del producto, uno de cuyos fines fundamentales es transmitir los conocimientos de los datos ecotoxicológicos, indispensables en cuanto a precauciones de manipulación y vertido de resíduos.

A pesar de esta concienciación, es todavía poco conocido el significado de algunos de los parámetros tales como las palabras "toxicidad y ecotoxicidad" y lo que representan actualmente. Este es el motivo por el cual se hace una revisión general de las principales nociones y planteamientos toxicológicos, de tal manera que puedan ser útiles además de para aclarar ideas, comprender mejor el importante servicio de la toxicología a las diversas áreas de la industria en la preservación del medio ambiente.

## 2. ECOTOXICIDAD

La ecotoxicidad es un concepto que se refiere al estudio de los efectos tóxicos producidos por agentes físicos y químicos en el ambiente. La Ecotoxicología engloba:

Contaminación ambiental urbana
Contaminación de espacios naturales
- animales
- vegetación
- hombre

es decir que trata de los efectos sobre el ecosistema completo.

La ecotoxicología o toxicología ambiental ha adquirido en los últimos tiempos extraordinaria importancia, hasta el punto de haberse promovido en varios países una nueva especialidad, (entre ellos España desde 1973).

Este hecho se ha debido a varias circunstancias:

a) a la considerable expansión de la industria.
b) al crecimiento simultáneo de las diferentes ramas de la química industrial:

orgánica, de los plásticos y resinas, alimentaria, farmacéutica, agrícola y química nuclear.

c) al reconocimiento de los derechos del trabajador contra los posibles peligros tóxicos en el seno de la industria.

Se establecen una serie de normas y decretos de clasificación de las enfermedades profesionales dictando normas médicas por las que se han de regir los diagnósticos y la calificación de los distintos tipos de enfermedades.

En abril de 1970 se creó el Plan Nacional de Higiene y Seguridad en el trabajo, dependiente del Instituto Nacional de Previsión del Ministerio de Trabajo, que posteriormente se integró en el Ministerio de Sanidad y Seguridad Social (1977) y luego de nuevo en el de Trabajo.

De manera similar habría que considerar la contaminación ambiental urbana, con su incidencia en la salud del ciudadano, en el paisaje y en las obras culturales (pictóricas, escultóricas, arquitectónicas o de ingeniería), así como la contaminación de los espacios naturales (animales y vegetación) todo ello materia de la Ecotoxicología.

## 3. EXPERIMENTACIÓN

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse, ap arte de las previsiones teóricas, por dos vías: estudios retrospectivos de casos de intoxicación y ensayos experimentales con animales y plantas. Sólo en muy contadas ocasiones se efectúa experimentación con seres humanos, debido a las implicaciones éticas y legales que ello ocasiona; de estudios retrospectivos sobre intoxicaciones ocurridas en humanos se obtienen los datos de "toxicidad humana estimada" (Repetto, 1988)

Los estudios toxicológicos con plantas están promovidos no sólo en interés de los productos fitosanitarios y del conocimiento de la fitotoxicidad de productos de uso agrícola (y sus frecuentes contaminaciones), sinó también por la necesidad de conocer el metabolismo, transformación y retención de las sustancias tóxicas por los vegetales de consumo animal o humano.

Algunas técnicas utilizan plantas inferiores para el análisis toxicológico, como la desarrolada por Repetto y Sanz (1977) para la detección de herbicidas en sangre de intoxicados, u otras muestras, mediante cultivos de algas en placa de agar, al estilo de los antibiogramas. Sobre placas de agar sembradas con microalgas se colocan pequeños discos de papel impregnados del material sospechoso. Algunos

compuestos inducen la aparición de halos de inhibición del crecimiento del cultivo, mientras que otros como los herbicidas hormonales etc, estimulan el crecimiento por lo cual se originan halos de gran densidad.

### 3.1 Protocolo en toxicología experimental

El planteamiento de un protocolo de toxicología experimental con animales presenta, a priori, cuatro cuestiones que se deben resolver:

a) especie animal a utilizar
b) número total y de grupos de animales
c) vías de administración que se deben emplear
d) tiempo de duración del estudio

Normalmente las soluciones a estos problemas son de carácter exclusivo para cada estudio, según el tipo de sustancia y el uso a que se destina.

a) Especie animal - En general se utilizan animales pequeños, por razones económicas, como ratón, hámster, rata, cobayo, conejo y perro. En casos más concretos: aves, peces, gatos y monos.

La mayor seguridad y fiabilidad de los datos se obtiene empleando siempre más de una especie animal. En todo lo concerniente a la estabulación y manejo de los animales es obligado cumplir los códigos de Prácticas Correctas de Laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

b) Número de animales - En cualquier grupo de individuos habrá unos más sensibles y otros más resistentes al tóxico. En general, la frecuencia de animales sensibles se distribuye de forma gaussiana en relación al logaritmo de la dosis.

c) Vía de administración - La elección de la vía de administración que se debe emplear se hace de acuerdo con el tipo de producto y la posible vía por la que el hombre lo absorbe. Así, un medicamento oral, cutáneo o parenteral requerirá tal vía de experimentación; un contaminante atmosférico deberá ser estudiado por las vías inhalatoria y cutánea. Es muy importante atender a la naturaleza del vehículo o medio de dilución empleado, y siempre es necesario el estudio de un grupo de animales control, a los que se aplique el vehículo solo, en idénticas condiciones ambientales y alimentarias.

d) Tiempo - Los estudios de toxicidad pueden desarrollarse con una sola administración (toxicidad aguda) o con tratamientos durante periodos cortos (toxicidad subcrónica), medios o largos (toxicidad crónica). Jamás debe olvidarse la observación a largo plazo y la posible aparición de carcinogénesis y teratogénesis y, a veces, la modificación de la fertilidad.

## 3.2 Toxicidad Aguda

Se entiende por toxicidad aguda la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos tras una sola dosis; estos efectos pueden variar desde una mera irritación cutánea a la muerte. Por ser un parámetro muy evidente, se ha considerado tradicionalmente la DL-50 (dosis capaz de producir la mortalidad a la mitad de la población) como el mejor indicativo de la capacidad tóxica de una sustancia.

Sin embargo, el avance de los conocimientos toxicológicos y la mayor frecuencia actual de las intoxicaciones crónicas han disminuido el valor y significación de la DL-50. A pesar de que diversas legislaciones siguen calificando la peligrosidad de las sustancias sólo en función a su toxicidad aguda (DL-50), está claro que ésta no puede considerarse como una constante biológica del producto, sinó que es un valor influible por numerosas variablers, que lo reducen al carácter de un mero parámetro relativo de referencia (Repetto, 1988).

En consecuencia, no se hace necesario esforzarse en obtener DL-50 con gran precisión, lo que simplifica el estudio y disminuye el número de animales sacrificados. A esta consideración se unen dos estimaciones que reducen el margen de interés de la DL-50.

a) Una DL-50 inferior a 25 mg/kg es tan fuertemente tóxica que no merece la pena determinarla con mayor exactitud.

b) DL-50 superiores a 5.000 mg/kg representan tan baja toxicidad aguda que tampoco deben ser investigadas.

Como consecuencia de todo ello se ha admitido internacionalmente el concepto de toxicidad aguda aproximada que clasifica las sustancias en varias categorías conforme a una DL-50 aproximada por vía oral en mamíferos tal como puede observarse en las Tablas 2 y 3.

**TABLA 2**
**Rangos de Toxicidad. Administración vía oral**

I. Muy tóxica: DL-50 inferior o igual a 25 mg/kg.

II. Tóxica: DL-50 inferior o igual a 250 mg/kg.

III. Nociva: DL-50 inferior o igual a 2.000 mg/kg.

IV. Sin toxicidad aguda (pero sin prejuzgar efectos crónicos, carcinogénesis, etc.): DL-50 igual o superior a 5.000 mg/kg.

**TABLA 3**
**Rangos de toxicidad*. Vías de administración**

| Rango de toxicidad | Denominación usual | Dosis oral única, rata DL50 | Dosis cutánea única, conejo DL50 | Inhalación vapor 4 h. CL50, ratas ppm | Posible dosis letal hombre |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Extremadamente tóxico | <1 mg/kg | <5 mg/kg | 10 | 1 gota, 1 gramo |
| 2 | Altamente tóxico | 1-50 mg/kg | 5-50 mg/kgç | 10-100 | 1 cucharilla (4 ml) |
| 3 | Moderadamente tóxico | 50-500 mg/kg | 50-350 mg/kg | 100-1.000 | 30 g. |
| 4 | Ligeramente tóxico | 0,5-5 g/kg | 0,35-3 g/kg | 1.000-10.000 | 250 g. |
| 5 | Prácticamente no tóxico | 5-15 g/kg | 3-25 g/kg | 10.000-100.000 | 1 litro |
| 6 | Relativamente inocuo | >15 g/kg | >25 g/kg | >100.000 | > litro |

De: Deichmann, W.B. y Gerarde H. W. Toxicology of drugs and chemicals. Academic Press, Nueva York, 1969.
* Se refiere exclusivamente a toxicidad aguada.

Al igual que para mamíferos, para los organismos acuáticos existe también una clasificación según los distintos grados de toxicidad de las sustancias tal y como puede verse a continuación en la Tabla 4.

**TABLA 4**
**Rangos de Toxicidad con organismos acuáticos**

| Grado | Descripción | TLm (CL 50) 96 h |
|---|---|---|
| 0 | Peligro insignificante | >1.000 mg/l |
| 1 | Prácticamente no tóxica | 100 - 1.000 mg/l |
| 2 | Ligeramente tóxica | 10 - 100 mg/l |
| 3 | Moderadamente tóxica | 1 -10 mg/l |
| 4 | Altamente tóxica | < 1 mg/l |

Se ha considerado que si la sustancia no llega a ser letal según este ensayo a concentración máxima de 1.000 mg/l entonces no supone mayor peligro para la vida acuática. Según Niosh (1976) para efectuar esta clasificación de márgenes de toxicidad se han tomado datos de los ensayos de CL 50 96 h con organismos acuáticos jóvenes o adultos, normalmente con los niveles superiores de la cadena alimentaria; admitiéndose que los estadios de larva o huevo puedan ser más susceptibles que los organismos testados.

### 3.3 Toxicidad crónica

La longevidad está en razón directa al peso corporal. Por ello los 70 años de promedio de la vida humana se equiparan a los 2-4 años de la rata; por tanto, el plazo de administración para los estudios de cronicidad tendrá en cuenta estas proporciones. En general y de acuerdo con la OMS, para los estudios de cronicidad se recomiendan plazos de 6-18 meses. A los 90 días debe sacrificarse una muestra de todos los grupos en estudio, para observación histológica.

Por acuerdo internacional, para evitar confusiones, se ha sustituido la expresión "toxicidad subaguda" por la de toxicidad subcrónica para aludir a ensayos con administraciones diarias, durante un periodo de tiempo inferior al 10 % de la vida media del animal empleado.

Los estudios de toxicidad crónica a medio y a largo plazo no se diferencian más que en su longitud. Los primeros deben durar por lo menos 3 meses y los segundos de 1 a 2 años, nunca menos de 6 meses, y finalmente se sacrifican todos los animales, se les realiza la autopsia y el estudio anatomopatológico macroscópico, pesándose los órganos y disponiéndose para el estudio microscópico.

Los ensayos prolongados de toxicidad con peces se utilizan para la medición de efectos (letales o no) durante la exposición a las sustancias contaminantes. Como efectos no letales se consideran el aspecto, el tamaño y el comportamiento, siempre en relación a los peces control, por ejemplo: diferencias en el comportamiento natatorio, distinta reacción frente a un estímulo externo, disminución o cesación de las ingestas, cambios del tamaño o peso del cuerpo.

### 3.4 Alternativas al uso de animales: Toxicidad in vitro.

Miles de productos químicos se someten cada año a rigurosas pruebas, ordenadas a evaluar su potencial toxicidad. La inmensa mayoría de ellas se realizan con animales: las reacciones que muestran ratas, conejos, ratones y peces ante los preparados químicos constituyen por ahora los mejores ensayos disponibles para predecir los efectos que dichas sustancias ejercerán sobre el organismo humano.

En la última década, el problema de las pruebas de toxicidad con animales adquirió tintes apremiantes y polémicos. Las sociedades protectoras de animales denunciaron el sufrimiento de millones de éstos y las industrias que fabrican productos químicos para el mercado empezaron a preocuparse por los costes y retrasos impuestos por las pruebas.

Los riesgos que comporta la utilización de productos químicos peligrosos ha favorecido que los toxicólogos comenzaran a estudiar vías alternativas posibles, de manera que su investigación ha conducido a una nueva metodología: la de las pruebas de toxicidad in vitro.

El estudio de las transformaciones metabólicas y procesos de toxicidad y desintoxicación de un compuesto químico puede realizarse no ya utilizando un ser vivo entero, sinó tan sólo un órgano aislado o una pequeña porción del mismo o incluso un cultivo de células; siendo muy usados los organismos unicelulares, bacterias, huevos de pollo fecundados y embriones de rana. La experiencia in vitro permite establecer unas condiciones que pueden controlarse y muy adecuadas para estudiar el mecanismo de acción de los tóxicos a nivel celular (Brusick, 1977) y subcelular y supone una parte de los métodos llamados alternativos propuestos para disminuir el empleo de animales de experimentación.

La centrifugación diferencial facilita la obtención de fracciones subcelulares, como membranas, microsomas, mitocondrias, polisomas sobre los cuales poder estudiar aisladamente la accion del tóxico. Pero a pesar de todos estos progresos técnicos que permiten esclarecer los procesos tóxicos a niveles cada vez más profundos, no podemos olvidar la observación del animal intacto y los tejidos in vivo para no sobrevalorar resultados obtenidos en condiciones, en gran medida, artificiales.

### 3.5 Correlación entre la toxicidad animal y la humana

Se ha efectuado amplísima investigación para tratar de determinar esta correlación, y se ha llegado a la conclusión de que ningún animal, ni siquiera el primate, responde a los tóxicos exactamente igual que el hombre, pero que la mayoría de los efectos que experimentan los animales de laboratorio bajo la accion de los fármacos los manifiesta también el hombre, y a la inversa. Exceptuando los procesos inmunológicos, que son distintos, las diferencias son más de tipo cuantitativo que cualitativo.

Al extrapolar los resultados experimentales con animales (Barnthouse, et al. 1989) al hombre, o los datos de un pequeño número de indivíduos a una población, se presentan incertidumbres difíciles de resolver. Para ello se ha propuesto aplicar unos factores de seguridad que van de 1 a varios miles, con los que se divide la dosis experimental para admitirla como segura.

Cuando los datos se han obtenido con humanos, si el riesgo previsible no es muy grande, y cuando la población supuestamente expuesta tampoco lo es, se aceptan factores de 1 a 5.

En los casos en que los datos proceden de animales, si el riesgo es grande y si se supone que va a estar expuesta la población general, se propone un factor de 1.000.

Para los aditivos alimentarios no carcinógenos, se acepta dividir por 100 (10 por se el hombre más sensible que los animales y nuevamente por 10, para cubrir la heterogeneidad del género humano) la dosis sin efecto adverso observables (Vettorazzi, 1977).

Se han propuesto varios procedimientos para extrapolar los resultados experimentales y obtener una dosis límite que sea inferior a la requerida para producir efecto. De estos modelos son de destacar los basados en la regla del peso corporal, el impacto singular y el probit.

La regla del peso corporal admite que los logaritmos de las variables o parámetros biológicos de los mamíferos muestran una regresión lineal con los logaritmos del peso corporal (Krasovskij, 1976). El método probit produce curvas cóncavas con dosis bajas y es menos prudente que el modelo de impacto singular, aunque exige un límite superior de confiabilidad del 99 %.

El modelo del impacto singular (Hoel, 1975) presupone que cada efecto se debe a la acción de una unidad eficaz de dosis sobre un receptor singular; equivale al modelo lineal dosis-efecto.

### 3.6 Relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta

Efecto es la manifestación de la acción de un compuesto que modifica algún mecanismo bioquímico o función fisiológica. Este cambio debido a la interacción a nivel molecular entre el xenobiótico y los constituyentes biológicos puede no ser evidente (subclínico) o manifiesto (clínico), que incluso a veces puede medirse de manera objetiva. Normalmente se utilizan como sinónimos los términos efecto y respuesta, pero éste último sirve para designar el porcentaje de población en que se manifiesta un efecto. El efecto va ligado a dos variables: dosis y tiempo, pero frecuentemente se considera sólo el binomio dosis-efecto. Esta relación puede ser de dos tipos:

a) Cuántica: cuando responde a la ley del todo o nada; es decir que ante una dosis el individuo presenta el máximo efecto posible o no experimenta nada.

b) Gradual: cuando el efecto es función de la dosis. La representación de esta relación se aproxima a una hipérbola (Fig. 1) que muestra cómo al aumentar la dosis se incrementa el efecto hasta llegar a una dosis Dm en la que se alcanza un efecto máximo y la curva se hace asintótica.

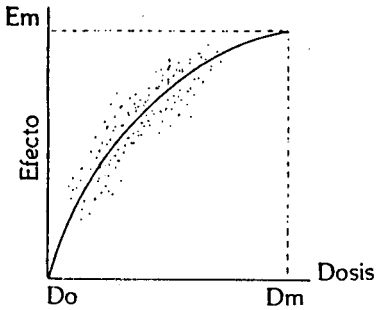



**Fig. 1** —Representación ideal de la relación dosis-efecto.

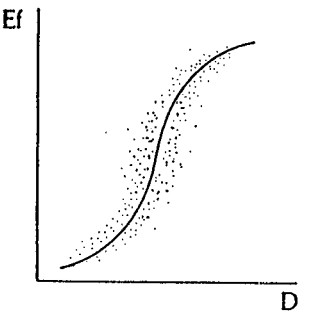



**Fig. 2** —Algunas relaciones dosis-efecto presentan forma sigmoidea.

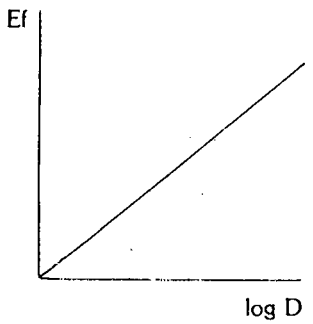



**Fig. 3** —Representación semilogarítmica.

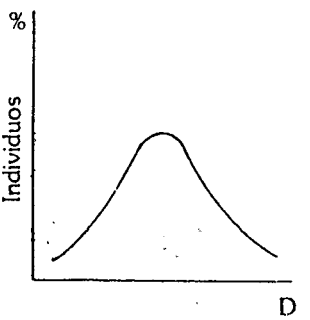



**Fig. 4** -Curva dosis-respuesta (frecuencia de individuos).

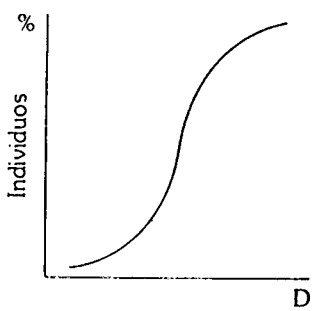



**Fig. 5** —Respuesta acumulada.

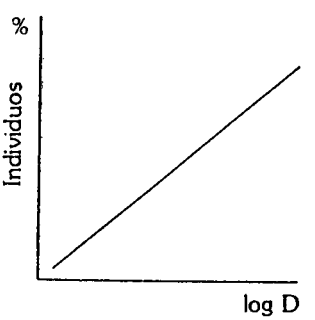



**Fig. 6** —Representación semilogarítmica de la respuesta acumulada.

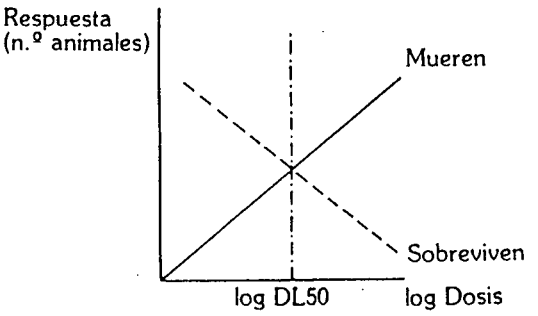



Figura 7

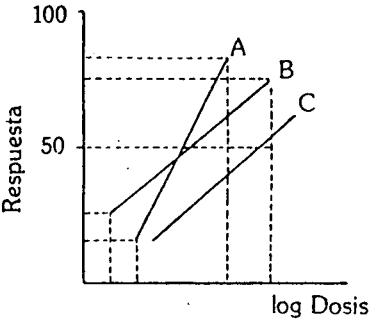



Figura 8

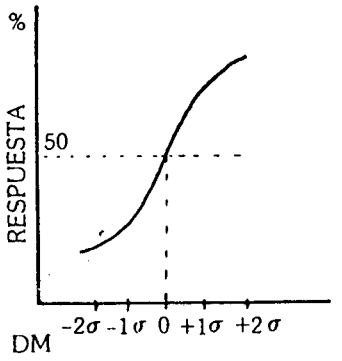



Fig. 9 —Variaciones de la respuesta por desviaciones de la dosis.

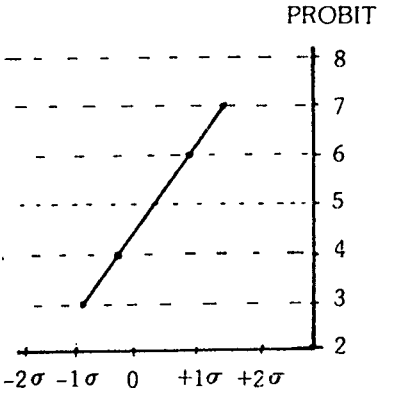
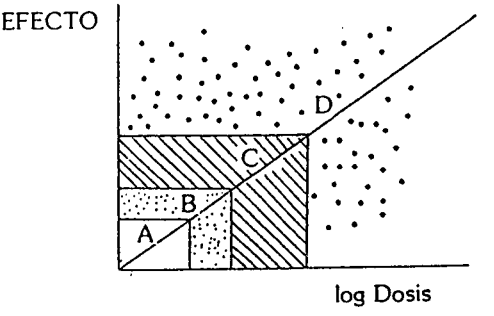



Fig. 10 —Expresión de la respuesta en probits.



En algunas relaciones la correlación fluctúa y se obtiene una sigmoide (Fig. 2). Cuando se representa el efecto frente al logaritmo de la dosis se obtiene una recta (Fig. 3). Pero a veces, en lugar de considerar el efecto se maneja el valor del porcentaje de éste sobre el efecto máximo ($E/E_m$ x 100).

Para calcular la relación dosis-efecto conviene recoger datos de muchos individuos, y como ocurre que para una misma dosis, en una población dada, no todos los individuos experimentan idéntico efecto, denominamos respuesta a la proporción (%) de esa población que manifiesta el efecto requerido (Klaarsen y Doull, 1975). A partir de aquí se pueden obtener las curvas dosis-respuesta, que cumplen la "ley biológica de distribucion al azar".

Como en una población hay siempre elementos más sensibles y otros más resistentes, al representar el número de indivíduos que muestran el mismo efecto frente a una misma dosis, se tiene una curva de Gauss (Fig. 4), que puede se simétrica o no.

Dado que a cierta dosis el número de indivíduos afectados es igual a la suma o acumulación de todos ellos que se afectan por dosis menores a la administrada, puede obtenerse también la curva de frecuencias o de respuestas acumuladas, que es una sigmoide (Fig. 5). Esta se puede transformar en recta (Fig. 6) en representación semilogarítmica, es decir representando la respuesta frente al logaritmo de la dosis.

De todas estas curvas se puede extrapolar la respuesta que producirá una dosis. Esto puede hacerse de varias maneras; el modelo del impacto singular (una dosis = un efecto) supone una relación lineal, y significa que los individuos que sobreviven a una dosis dada resistirán a una dosis menor.

El modelo de relación lineal permite calcular gráficamente la $DL_{50}$. En ordenadas se presenta el número de animales utilizados en la experiencia y en abcisas las unidades de dosis en proporciones geométricas cuyos logaritmos aumentan uniformemente. Señalando el número de animales que mueren o que sobreviven con cada dosis tendremos dos líneas cuya intersección corresponde a la DL50 (Fig. 7).

Las representaciones semilogarítmicas de las curvas dosis-efecto y dosis-respuesta permiten deducir la toxicidad de una sustancia a partir de la pendiente de la recta; cuanto más próxima a la vertical sea ésta, hay mayor incremento en la respuesta para un intervalo de dosis, por lo que la sustancia será más tóxica (A) siempre que se considere la misma vía de administración. De dos rectas paralelas, será más peligrosa la sustancia cuyo efecto se inicia a dosis inferiores (B) (Fig. 8).

Otra forma de considerar la respuesta es estimando la probabilidad de que se produzca. Para ello se utilizan los probits, que son unidades de probabilidad que se corresponden a las desviaciones ($\sigma$) con respecto a la media. A la dosis $DL_{50}$ ($\sigma$=0) hay el 50 % de respuesta con valor de 5 probits (Fig. 9).

Para transformar el porcentaje de respuestas en probits se pueden utilizar fórmulas matemáticas o tablas de bioestadística, o representando la curva de dosis-repuestas en papel semilogarítmio probabilístico (Fig. 10).

De acuerdo con el carácter relativo de la toxicidad, al representar gráficamente la relación dosis-efecto pueden encontrarse las siguientes áreas de correspondencia indicadas en la Figura 11:

A. Sin efecto aparente favorable o desfavorable.
B. Zona de aplicación terapéutica.
C. Efectos tóxicos transitorios o reversibles.
D. Efectos tóxicos irreversibles.

### 3.7 Reglamentaciones sobre la experimentación toxicológica.

En los últimos tiempos están apareciendo normativas legales que afectan la experimentación toxicológica, incidiendo sobre ella desde dos puntos distintos.

Por un lado, la legislación internacional exige que cualquier nueva sustancia que vaya a ser puesta en el mercado sea objeto de una declaración con un amplio estudio de sus características fisicoquímcas, analíticas, toxicológicas, y ecotoxicológicas (difusión, persistencia y efectos sobre los ecosistemas).

Hacia 1970 la FDA norteamericana discrepó con una importante compañía farmacéutica sobre los estudios de toxicidad realizados a un producto antiprotozoario. Como consecuencia se inició una minuciosa revisión de los protocolos seguidos por aquel y otros laboratorios farmacéuticos, que condujo a una denuncia judicial y condena de cárcel para algunos investigadores (Internal Memo, Health Education and Welfare, Searle Investigation Task Force Final Report, Washington, 1976). Todo ello produjo una gran conmoción pues se pensó que lo descubierto podría no ser más que la "punta de un gran iceberg", por lo que la FDA elaboró unos principios o códigos (FDA. Federal Register, USA. Noclinical laboratory studies. Good Laboratory Practice Regulations, 1978, que han sido adaptados o incluidos en las legislaciones de la OCDE (1981) y Comunidad Económica Europea (CEE) (1979) y aisladamente por numerosos países.

La Directriz 87/18/CEE aplica a la Comunidad Europea la normativa de la OCDE, disponiendo su cumplimiento por los estados miembros antes del 30 de Junio de 1988, y la ley 87/13 establece las formas de inspección.

Estos principios se conocen como Código de Prácticas Correctas de Laboratorio (en inglés GLP) y se conocen todos los requisitos exigibles para que un estudio experimental sea homologable o aceptable no sólo por el propio país, sinó también en el extranjero (reconocimiento mútuo), y no se circunscribe a la toxicología experimental, sinó que afecta también a los certificados de análisis de composición, farmacocinéticos, bioensayos, etc. Los requisitos se refieren a la capacitación y cualificación del personal, métodos operativos (con especial atención a los controles de calidad), instalaciones, archivos y registros, etc.

Con respecto a los bioterios o animalarios, las GLP exigen la instalación de barreras sanitarias, pasillos limpios y servicios independientes, aire filtrado, con temperatura, humedad y ventilación controladas, etc.

La más reciente legislación española sobre estas materias es el Real Decreto 3349/1983, que establece la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Comercialización y Utilización de Plaguicidas, y el Real Decreto 2218/1985, con el Reglamento sobre Declaración de Sustancias Nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de sustancias Peligrosas; por otra parte se espera la publicación de la normativa reguladora de la utilización de los animales de experimentación.

Frente a estas normativas que requieren concienzudos estudios, realizados en las mejores condiciones materiales y científicas y con suficiente número de animales tratados y controles como para que los resultados puedan ser considerados estadísticamente significativos, se publican otras reglamentaciones que regulan el empleo de animales de experimentación, tratando de reducir el númro de éstos. Así, el convenio suscrito por los estados miembros del Consejo de Europa "para la protección de vertebrados utilizados para fines experimentales y científicos" tiene como objetivos la reducción de los animales utilizados en los laboratorios y el empleo de procedimientos que eviten los sufrimientos a los mismos, así como propugna el desarrollo de métodos alternativos que no requieran el uso de animales.

## 4. BIOENSAYOS

El diseño de los bioensayos para la predicción del riesgo de la presencia de xenobióticos (sustancia extraña) en el medio ambiente, se hará teniendo en cuenta los fines que se persigan, según se pretenda conocer la cinética, la toxicidad o las interacciones que puedan producirse.

Si se trata de estudiar la cinética del compuesto se plantearán estudios de:

- Movilidad
- Compartimentación Ambiental
- Biodegradabilidad
- Acumulación en sectores específicos
- Metabolismo en general

La cuantificación de la toxicidad podrá referirse a:

- Ecosistemas acuáticos o terrestres
- Producto parenteral
- Productos de transformación

Para observar las posibles interacciones se realizarán las siguientes pruebas:

- Magnificación
- Sinergismo
- Antagonismo
- Detoxificación
- Cripticismo

## 4.1 Niveles de estudio

La presencia de xenobióticos en el ecosistema puede inducir respuestas muy variadas por parte de los componentes vivos del mismo.

I. Nivel de suborganismo

Bayne (1986) estudió las respuestas a nivel celular y bioquímico de los organismos marinos a los contaminantes. Algunos procesos celulares reflejan una gran especificidad por un tipo particular de polución: por ejemplo la producción de metalotioneinas que es una respuesta típica a la presencia de metales traza.

La inducción del enzima citocromo P-450 del sistema de oxidasas de función mixta, es característico en las series de reacciones que metabolizan compuestos orgánicos.

La desestabilización de los liposomas puede usarse como un índice de sensibilidad al daño celular.

II. Nivel de organismo

Es importante destacar los estudios fisiológicos y los de letalidad y cronicidad.

Ensayos fisiológicos - La polución afecta a los organismos, lo cual inducirá respuestas a nivel fisiológico como la variación de la tasa de crecimiento, medido por el ritmo de alimentación y metabolismo. Estos criterios son mucho menos específicos que los bioquímicos mencionados anteriormente, pero reflejan más directamente lo que ocurre a nivel de indivíduo. Según Bayne la extrapolación de los estudios fisiológicos para predecir el posible daño a nivel de población es difícil puesto que hay una pérdida de información, y no siempre el daño individual es visible a nivel de población.

Estudios de letalidad - La mejor información sobre las relaciones concentración y respuesta de los compuestos químicos en el medio es sin lugar a dudas la CL50, expresando los efectos letales a corto plazo. Puesto que hay muchas dificultades en el mantenimiento y cultivo de organismos, la mayoría de los ensayos se realizan con un número limitado de especies las cuales son fáciles de mantener, de manipular y de cultivar en el laboratorio.

Estudios de cronicidad - El principal objetivo de estos estudios es la predicción de los efectos a largo plazo, sobre la supervivencia, crecimiento y reproducción. Puesto que estos estudios pueden llegar a durar varios meses, sólo se llevan a cabo en un número limitado de laboratorios.

III. Nivel de supraorganismo

Este tipo de experimentos consiste en la creación de modelos de ecosistemas. Se prepara un microcosmos con mezclas bien definidas de productores, consumidores y descomponedores, la cual proporciona una información muy interesante del efecto de los tóxicos en la dinámica e interacciones de las poblaciones presentes. Sin embargo la extrapolación a la biosfera total es de nuevo difícil.

### 4.2 Bioensayos acuáticos más frecuentes

Es cada vez mayor el uso de los test de toxicidad a escala nacional e internacional (Persoones, 1987). Las regulaciones y directivas de la CEE para la evaluación del peligro que suponen los compuestos químicos han favorecido que se tenga muy en cuenta el costo de este tipo de ensayos (Persoones, y Van der Vel, 1987).

Teniendo en consideración este tema la Directiva 67/548 de la CEE presenta una clasificación de los cinco ensayos más adecuados:

- Toxicidad aguda con Dphnia
- Toxicidad aguda con Peces
- Inhibición del crecimiento con Algas

- Toxicidad prolongada con Daphnia
- Toxicidad prolongada con Peces

## 5. CONCLUSIONES

La toxicología ambiental ha adquirido en los últimos tiempos extraordinaria importancia, hasta el punto de haberse promovido en varios países una nueva especialidad, entre ellos España desde 1973.

Como ya hemos mencionado, la industria química en general y concretamente la industria textil ha comenzado desde hace tiempo a sensibilizarse de manera que junto a los aspectos puramente técnicos y económicos, van adquiriendo mayor significado los puntos de vista ecológicos (Rosenthal, 1990). Empresas productoras, fabricantes y consumidores se enfrentan a los riesgos de los productos tanto para el hombre como para el medio ambiente. Las empresas de productos químicos editan las hojas de datos de seguridad del producto, uno de cuyos fines fundamentales es transmitir los conocimientos de los datos ecotoxicológicos, indispensables en cuanto a precauciones de manipulación y vertido de resíduos.

Finalmente y con el objetivo de acercar nuestra actividad a las empresas y a la sociedad hay que mencionar que en el Instituto de Investigación Textil pueden realizarse la mayoría de los parámetros indicados en la Tabla 1, y que fue hacia el año 1980 cuando se inició la línea de ecotoxicología. Se realizan pruebas de toxicidad a corto, medio y largo plazo con organismos acuáticos pertenecientes a distintos niveles de organización biológica y siguiendo la normativa de la OCDE (201,202, 203, 204, 305, (1984, 1985, 1987). Podemos destacar las siguientes especies:

| | | |
|---|---|---|
| Peces | Pez cebra | *Brachidanio rerio* |
| | Carpín dorado | *Carassius auratus* |
| | Trucha | *Oncorhynchus myukiss* |
| Crustáceos | Pulga de agua | *Daphnia magna* |
| Algas | Microalgas | *Chlorella vulgaris* |
| | | *Scenedesmus subspicatus* |
| | | *Selenastrum capricornutum* |

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1) Barnthouse, L.W. Suter, G.W.II, and Rosen, A.E. Inferring population level significance form individual-level effects: An extrapolation from

fisheries Science to Ecotoxicology. In Aquatic toxicology and Environmental Fate: Eleventh volume ASTM STP 1007. G.W. Suter II and M. A. Lewis, Eds. American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1989, pp. 289-300.

2) Bayne (1986). In Toxicología fundamental Ed. Científico Médicas. 2ª edició 1988, p. 408.

3) Brusick, D.J. In vitro mutagenesis assays as predictors of chemical carcinogenesis in mammals. In Toxicology annual Vol. 2 by Ch. L. Winek. ed. Marcel Dekker Inc. New York and Basel, 1977 pp. 79-109.

4) Deichmann W.B. and Gerarde H. W. Toxicology of Drugs and Chemicals. Academic Press, Nueva York 1969. In Toxicología fundamental Ed. Cintífico Médicas. 2ª edición 1988, p. 408.

5) Directiva 79/831 CEE.

6) Directriz 87/18/CEE.

7) Fairhurst, S. Interpretation of data submitted under the 6th .Amendment: Toxicology. J.S.D.C. Vol. 105 Sept. pp. 310-315, 1989.

8) Hardt, P. Environment-friendly textile softeners. Melliand Eng. 9/1990, pp. 326-328. Tnaslation of Melliand Textilberitche 71 (1990), p. 699.

9) Hobbs, S.J. Acquisition and use of data for assessment of the environmental impact of colorants. J.S.D.C. Vol. 105 October pp. 355-362, 1989.

10) Hoel, D. et al. Estimation of risks of irreversible delay toxicity. J. Tox. Env. Health, 1, 1, 133, 1975.

11) Klaassen, C.D. and J. Doull. In "Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Second Edition. Ed. McMillan Pb. 1975.

12) Ley 87/13.

13) Krasovskij, G.N., Extrapolation of experimental data from animal to man. Environ. Health Perspect., 13, 51-58, 1976.

14) Niosh. Registry of toxic effects of chemical substances. Edition 1976.

15) OCDE 201. Alga, Growth inhibition test.

16) OCDE 202. Daphnia sp., Acute immobilisation test and reproduction test.
17) OCDE 203. Fish acute toxicity test.
18) OCDE 204. Fish prolonged toxicity test: 14 days study.
19) OCDE 305. Bio accumulation test. Chronic test.
20) OCDE Guideline forTesting of Chemicals 1984.
21) OCDE Les test Biologiques d'Effluents et d'Eaux Réceptrices. 1985.
22) OCDE Monographies sur l'Environnement. Nº 11. Utilization des test Biologiques pour l'evaluation et le contrôle de la pollution de l'eau. 1987.
23) Directivas y Decisiones de las Comunidades Europeas, Referentes al Agua. Centro de Estudios e Investigación del Agua (1973-1986).
24) Persoones G. - Hazard Prediction and Relevance of Laboratory Scale Studies. 1987.
25) Persoones G. and Van der Vel. - Cost Analysis of 5 Current Aquatic Ecotoxicological Tests. 1987. Lab. for Biological Research in Aquatic Pollution. State Univesity of Gent, Belgium.
26) Real Decreto 3349/1983.
27) Real Decreto 2218/1985.
28) Repetto M. - Toxicología fundamental Ed. Científico Médicas. 2ª edición 1988, p. 408.
29) Repetto M. y P. Sanz. (1977). En Toxicología fundamental Ed. Científico Médicas. 2ª edición 1988, p. 408.
30) Rosenthal, P. Protección del medio ambiente e higiene laboral desde el punto de vista del fabricante de colorantes. ¿Hasta qué punto son peligrosos los colorantes textiles?. ITB Tintorería/Acabado/Estampado 1990 pp. 58-66.
31) Vettorazzi, (1977). In Toxicología fundamental Ed. Científico Médicas. 2ª edición 1988, p. 408.

*Trabajo recibido en 1991.02.20 - Aceptado en 1991.03.25*

# EDUARDO B PINEDA Y CIA., S. L.

ALAVA, 61, 5º 2ª - 08005 BARCELONA / CORRESPONDENCIA: APDO. CORREOS 21025 - 08080 BARCELONA
TELÉFONO 300 30 51 TELEFAX 300 46 51 TELEX 54721

**Schlafhorst**
- Hiladora-bobinadora Autocoro.
- Bobinadoras automáticas con anudado convencional o splicer, etc.

**SUCKER+MÜLLER**
- Encoladoras de diferentes tipos para fibras cortadas y filamento continuo.
- Instalaciones de cocción para las colas. Instalaciones de tintura a la continua, etc.

**Zinser**
- Manuares.
- Mecheras.
- Continuas con CO-WE-MAT, para algodón, lana y mezclas.
- Accesorios.

**Barmag**
- Maquinaria para hilanderías de filamento.
- Continuas doble torsión para toda clase de fibras.
- Máquinas de texturizar.

S.A. MÉTIERS AUTOMATIQUES
**PICAÑOL** YPRES
- Máquinas de tejer Airtronic, de toberas de aire.
- Máquina de tejer pinzas GTM de alta velocidad hasta 8 colores.

**BENNINGER**
- Máquinas para el acabado en húmedo. Instalaciones de lavado, blanqueo, teñido, mercerizado.
- Vaporizadores.
- Jiggers, foulards, etc.

**Thies**
- Instalaciones de tintura y blanqueo para toda clase de fibras, en bobinas, plegadores, etc. Instalaciones totalmente automáticas.

**BARCO INDUSTRIES**

SYCOTEX
- Sistema de Gestión de Producción Integrado para la Industria Textil.

DESIGN-3
- Ordenador de diseño.

**GEIDNER**
- Accesorios de acero inoxidable para aparatos de tintura.

**JUNGBAUER**
- Instalaciones de aspiración para hilaturas de algodón, lana, tejedurías e industrias en general.

**Enka técnica**
- Componentes y aparatos de medida para la industria de las fibras sintéticas.

**SCHWAN**
- Cilindros de caucho «BECA-FLOOR» para máquinas de encolar.

**LOEPFE**

Aparatos de control electrónicos
- Purgadores de hilo óptico-electrónicos.
- Parahilos.
- Sistema evaluación de datos de producción.
- Sistema de medición de la longitud de hilo.

**RESEDA BINDER**
- Rodillos de parafina.

**JOSEF TIMMER**
- Máquina de limpiar canillas.
- Carretillas y elevadores para plegadores.
- Máquinas de aprestar, lavar, estampar y teñir madejas.