

162



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTIMACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL 50%) DE UNA SOLUCION HUMECTABLE DE *Trichoderma sp.*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
BRISS ANEL ZAMORA MEJIA

298617



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Rosa María Eréndira Páez Aguirre

VOCAL Ana María Vázquez Álvarez

SECRETARIO Elia Brosla Naranjo Rodríguez

1er. SUPLENTE Liz Jannete Medina Reyes

2do. SUPLENTE María de Lourdes Mayet Cruz

Sitio de realización:

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Reprodutor de Organismos Benéficos NALET y en el Laboratorio de la Sección de Farmacología de la Facultad de Química. UNAM. Edificio "A" - 1E

MÉXICO, D.F.

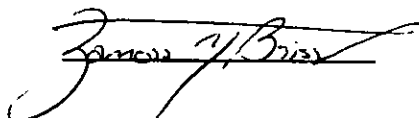
ASESOR:

ELIA BROS LA NARANJO RODRÍGUEZ.



SUSTENTANTE:

BRIS ANEL ZAMORA MEJÍA.



PROLOGO

Por Eric I. Pérez P

Comencemos desde el principio, creo que es lo mejor...

La nueva generación - bautizada como la Generación X, los baby busters, o la generación de los Internet-business-, tomará el poder en el mundo dentro de unos cinco a diez años y, en el 2005, la primera cosecha tendrá cuarenta años de edad. De esta manera un número creciente de estos seres humanos asumirán presidencias de gobiernos, serán directivos de organizaciones, ocuparán tronos o sillones de primer ministro en las principales naciones del mundo. Gente que nació con Internet entre el biberón y los pañales.

Los "X" crecieron en la resaca de los movimientos activistas de 1968, la alienación de sus padres al sistema, la renuncia de los idealistas, la última etapa de la guerra fría, y el desdibujamiento del mundo; así como el crecimiento tecnológico más vertiginoso en la historia de la humanidad, el deterioro de la misma y podríamos agregar a los medios masivos de comunicación como los padres suplentes.

La generación X es una suma de actitudes banales y reflexiones filosóficas extraídas de la televisión; son todos aquellos que viven en un estado contemplativo bajo la influencia de un vergonzoso nihilismo, sistematizado por la dura época de represión que les tocó vivir y los hace vegetar hacia un futuro incierto, como alguna vez sin saberlo lo predijera Borges. Inmersos en la renunciación los "X" se identifican en la apatía subversiva del consumismo y la comodidad, capaz de disolver cualquier intento de transformación.

Los miembros de la Generación X son la negación de un movimiento unificador, pues representan sólo un conglomerado de modas y actitudes dispersas entre sí, a diferencia de los *yuppies*, quienes buscan el poder mediante la preparación especializada, el control de los medios de producción y de los círculos políticos.

Ciertamente que ellos no van a querer repetir la falacia sin carácter cometida por sus padres, que recibieron una perversa tarjeta roja después de varias décadas de lealtad a la compañía para encontrar la seguridad laboral. La nueva generación X, en vista de lo que vivieron sus padres no desea respetar este pacto. Ya le tocó ver a sus padres estresados, tentando esconder sus angustias con un relajante vaso de whisky. Su creciente valor por el éxito personal y la falta de liderazgo, les obliga a dirigir la máquina del siglo XXI antes de lo que debe y, así, ven la muerte mimetizada al volante de peligrosas máquinas. Al navegar en la velocidad de la informática, se olvidan de que en el mundo real, en oposición al de los video-juegos, *una curva mal hecha mata*.

De qué se reirá la generación X

- Del organigrama de las empresas
- Del dinero en papel
- Del talonario de cheques
- De la Internet de 1999
- Del miedo al paro
- Del empleo fijo tradicional
- De las filas en los Bancos
- De las filas en los supermercados.
- De los neumáticos pinchados.
- De carrito en el aeropuerto
- Del teclado del ordenador

Los miembros de la primera generación X, cuyos miembros tienen ya treinta años de edad están trabajando:

- En empresas coligadas a las grandes corporaciones.
- En organizaciones vinculadas a Internet.
- En estructuras desmontables, desechables, descartables y virtuales.
- En empresas del área de sistemas, comunicación, servicios, franchising.
- Trabajan en otros países y manejan idiomas.
- Aceptan trabajar por proyectos y no sólo con empleo fijo. Por lo tanto, para la actual generación, son considerados como "inestables".

Atributos comunes

- Necesidad: consumir y competir
- Lema: aprovechar oportunidades
- Objetivo: tener éxito económico
- Símbolos de éxito: casa propia, casa de veraneo, coche de marca, viajes al extranjero.
- Placeres: comer, descansar, ver TV y conseguir tecnologías electrónicas
- Ideales: no hay banderas políticas ni creencias relevantes.
- Valores: persistencia, honestidad, abnegación, autenticidad y belleza.
- Actitud: difícilmente transforman ideas en acción.
- Fantasma: el paro
- Informática: herramienta de trabajo.
- Apariencia: culto a la belleza, delgadez, jovialidad y salud.
- Matrimonio: necesidad, antídoto contra la inseguridad del futuro.
- Bebidas alcohólicas: en alta. Relajan y aproximan amigos.
- Tabaco: en baja. Los fumadores son considerados poco respetuosos.

· Finalmente dicen que la felicidad no se compra con dinero, mientras su vecino no gane más.

Sin lugar a dudas que estamos frente a una sociedad de seres humanos que sienten la necesidad de unas relaciones sociales más profundas; anhelan alcanzar la felicidad por medio de sus referencias de vida y acaban transformándose en ávidos consumidores de auto-ayuda.

Esta vulnerabilidad se constituirá en el gran desafío a ser enfrentado por la generación X ya que cada vez más las empresas estarán solicitando profesionales con alta competencia emocional. El Siglo XXI, el ser humano será valorado en toda su plenitud y se constituirá en el verdadero diferencial competitivo de las organizaciones.

Nuestro futuro en proceso.

¿Es acaso la historia de una generación destinada a la vacuidad y a la lucha constante por encontrarse en un cuarto de "chat"? ¿Ó intentando llenar su soledad dando "forward" en su correo? ¿Aun estamos a tiempo de encontrar nuestro destino? o ¿acaso esta es nuevamente una falacia o algo completamente virtual "a doc" de nuestro tiempo y lenguaje?. Lo que es un hecho: nuestra capacidad de asombro se ha visto menguada con la tecnología y hemos suplantado nuestros roles de humano por los de una maquina, evaluados de acuerdo a la velocidad y capacidad de procesamiento.

Seremos capaces de sacar del mercado a los modelos obsoletos para ser reemplazados por un "equipo mejorado" o mas rápidos y permanecer impávidos viendo a nuestros congéneres caer.

Espero, con lo mas profundo de mi esencia, que esto no ocurra y deseo enormemente que esta tesis realizada con esmero, dedicación, entusiasmo obtenga los frutos esperados: demostrar que aun somos vulnerables, que el conocimiento no se adquiere solo frente a un monitor y que requerimos de todas nuestras capacidades, tanto emocionales como físicas para lograr nuestros deseos.

Que aun somos presas de algo que no conocemos: nuestro propio entorno y que debemos estudiarlo día a día sin olvidar la esencia misma del estudio, ayudar a comprender las interacciones del medio con nuestros semejantes para lograr una mejor calidad de vida.

Por mucho destino que nos auguren, aun no estamos exentos de autoflagelarnos creando o destruyendonos, tenemos la obligación de intervenir y modificar en nuestro destino negro o ¿permaneceremos inertes frente al televisor esperando ver discovery channel?

Dedico el presente trabajo a:

A mi MADRE

Ma. Teresa Mejía H.

por todo su apoyo y entereza,

pero sobre todo por todo el amor y comprensión,

gracias a ello he logrado todo lo que me he propuesto hasta el momento.

A mi ABUELA

Ofelia Hernández H.

por ser incansable e invatible,

que me ha dado el ejemplo para no rendirme.

A mi hermana

por jamás juzgarme y sin embargo apoyarme.

A tí que compartiste muchas noches de desvelo y esfuerzos,

pero sobre todo por las sanas discusiones,

por estar siempre presente apoyándome,

que por despistada o por orgullo no he valorado totalmente.

A todos aquellos ,

que de alguna manera han compartido conmigo su tiempo,

y conocimientos, que me han alentado a seguir mi camino con su

ejemplo.

Agradecimientos

A Leticia De Paz H y Nancy Mendez F, por integrarme a su equipo de trabajo, por dejarme conocer su manera de enfrentar los retos profesionales, pero sobre todo por la confianza otorgada.

A la Dra. Elia B. Naranjo Rodríguez,
por todas las observaciones y sugerencias,
en especial por la dirección de este trabajo.

A la Institución y profesores,
por todo el conocimiento transmitido,
no sólo a mi, sino a todos los profesionales que han formado.

Miembros del jurado,
por todas las correcciones realizadas a este trabajo
contribuyendo a su mejoramiento.

A todos aquellos que de algún modo colaboraron para finiquitar esta meta.

*"Hay equipos que luchan un día
y son buenos.
Hay otros que luchan un año
y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida:
esos son los imprescindibles."*

Berthol Brecht

*Toda la teoría del universo está
dirigida infaliblemente
hacia un solo individuo,
y ése eres TÚ*

Walt Whitman.

ÍNDICE

	Pág.
Carátula	I
Votos aprobatorios.....	II
Prólogo.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de gráficos.....	VIII
Resumen	1
I. Introducción	3
II. Revisión de la literatura	
2.1 Aspectos históricos de toxicología y farmacología.....	5
2.1.1 Etapa tradicional	5
2.1.2 Etapa moderna.....	5
2.1.3 Etapa contemporánea.....	6
2.2 Toxicología y farmacología	
2.2.1 Farmacología	6
2.2.2 Toxicología.....	7

	Pág.
2.3 Agente tóxico.....	7
2.4 Curva dosis - respuesta.....	9
2.5 Dosis letal media.....	10
2.6 Duración y frecuencia de la exposición.....	11
2.7 Plaguicidas.....	12
2.8 <i>Trichoderma sp.</i>	13
2.9 Sulfato de cobre.....	15
III. Objetivos e hipótesis	
3.1 Justificación.....	17
3.2 Objetivo general.....	17
3.2.1 Objetivos particulares.....	17
3.3 Hipótesis.....	18
3.4 Ensayos.....	18
IV. Ensayo con <i>Artemia salina</i> L.	19
4.1 Objetivo.....	20
4.2 Hipótesis.....	20
4.3 Material.....	20
4.4 Desarrollo experimental.....	21
4.5 Resultados y discusión.....	22
V. DL 50% aguda	
5.1 Modelos animales.....	27

	Pág.
5.2 Estimación de dosis letal media (DL 50%) aguda, vía oral..	30
5.2.1 Objetivo particular.....	31
5.2.2 Hipótesis.....	31
5.2.3 Material.....	31
5.2.4 Desarrollo experimental.....	32
5.2.5 Peso y cálculos.....	32
5.2.6 Resultados y discusión.....	33
5.3 Estimación de la dosis letal media (DL 50%) aguda, vía dérmica.....	38
5.3.1 Objetivo particular.....	38
5.3.2 Hipótesis.....	38
5.3.3 Material.....	39
5.3.4 Desarrollo experimental.....	39
5.3.5 Peso y cálculos.....	40
5.3.6 Resultados y discusión.....	41
VI. DL 50% subcrónica	
6.1 Estimación de dosis letal media subcrónica (DL 50%)s, vía oral.....	49
6.1.1 Objetivo particular.....	49
6.1.2 Hipótesis.....	50
6.1.3 Material.....	50

	Pág.
6.1.4 Desarrollo experimental.....	50
6.1.5 Peso y cálculos.....	52
6.1.6 Resultados y discusión.....	54
6.1.6.1 Resultados de patología.....	55
6.2 Estimación de dosis letal media subcrónica (DL 50%)s,	
vía dérmica.....	63
6.2.1 Objetivo particular.....	63
6.2.2 Hipótesis.....	63
6.2.3 Material.....	64
6.2.4 Desarrollo experimental.....	64
6.2.5 Peso y cálculos.....	66
6.2.6 Resultados y discusión.....	67
6.2.6.1 Resultados de patología.....	68
VII. Resultados generales y conclusiones	
7.1 Resultados.....	80
7.2 Conclusiones.....	82
VIII. Referencias bibliográficas.....	84
IX. Glosario.....	89
Anexo.....	95

Índice de cuadros

Cuadro		Pág
1	Categorías de toxicidad.....	11
2	Etapas de exposición.....	11
3	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma sp.</i>	13
4	Resultados en <i>Artemia salina</i> L.....	24
5	Clasificación taxonómica de la rata albina.....	28
6	Parámetros generales de la rata albina.....	29
7	Relación peso- volumen por administrar para DL 50% aguda, vía oral.....	32
8	Resultado de controles para DL 50% aguda, vía oral.....	33
9	Resultados para DL 50% aguda, vía oral.....	35
10	Relación peso- volumen por administrar para DL 50% aguda, vía dérmica.....	40
11	Resultados para DL 50% aguda, vía dérmica.....	44
12	Niveles de dosis para DL 50% subcrónica, vía oral..	51
13	Relación peso- volumen por administrar para DL 50% subcrónica, vía oral.....	52
14	Resultados para DL 50% subcrónica, vía oral.....	56
15	Niveles de dosis para DL 50% subcrónica, vía dérmica.....	65

	Pág.
16	Relación peso- volumen por administrar para DL
	50% subcrónica, vía dérmica..... 66
17	Resultados para DL 50 subcrónica, vía dérmica..... 69
18	Cuadro de resultados generales..... 78
19	Resumen de resultados patológicos para ensayos
	subcrónicos..... 79

Índice de figuras

Fig		Pág.
1	Curva dosis-respuesta de todo o nada.....	9
2	Algunas secciones incluidas en el género <i>Trichoderma</i> ..	13
3	Enrollamiento de <i>Trichoderma sp</i> sobre una hifa de <i>Rhizoctonia solani</i>	14
4	Larva y adulto de <i>Artemia salina</i> L.....	19
5	Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición aguda vía dérmica.....	46
6	Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición aguda vía dérmica.....	46
7	Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> sobre <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> , exposición aguda (1200 ppm), vía dérmica.	47
8	Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> sobre <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> , exposición aguda (1200 ppm), vía dérmica	47
9	Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> sobre <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> , exposición aguda (9000 ppm), vía dérmica..	48
10	Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> sobre <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> , exposición aguda (9000 ppm), vía dérmica.	48
11	Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición subcrónica (30 días), vía dérmica.....	71

	Pág.
12 Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición subcrónica (60 días), vía dérmica.....	71
13 Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición subcrónica (90 días), vía dérmica.....	71
14 Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> (1200 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición subcrónica (30días), vía dérmica.....	72
15 Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> (1200 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición subcrónica (60días), vía dérmica.....	72
16 Efecto causado por <i>Trichoderma sp</i> (1200 ppm) sobre <i>Rattus norvegicus</i> , exposición subcrónica (90días), vía dérmica.....	72

Índice de gráficos

Gráfico		Pág
1	Relación de dosis - organismos acumulados del control negativo en <i>Artemia salina</i> L.....	25
2	Relación de dosis - organismos acumulados del control positivo en <i>Artemia salina</i> L.....	25
3	Relación de dosis-organismos acumulados de <i>Trichoderma sp</i> en <i>Artemiasalina</i> L.....	26
4	Relación % - dosis para DL 50% aguda, vía oral.....	37
5	Relación UP - dosis para DL 50% aguda, vía oral.....	37
6	Relación % - dosis para DL 50% aguda, vía dérmica.....	45
7	Relación UP - dosis para DL 50% aguda, vía dérmica....	45
8	Relación % - dosis para DL 50% subcrónica, vía oral.....	57
9	Relación UP - dosis para DL 50% subcrónica, vía oral....	57
10	Relación %-dosis para DL 50% subcrónica, vía dérmica.	70
11	Relación UP-dosis para DL50% subcrónica, vía dérmica	70

RESUMEN

Estimación de la dosis letal media (DL 50%) de una solución humectable de *Trichoderma* sp.

Es lógico y necesariamente ético pensar que no basta con demostrar que una sustancia química o biológica es efectiva, también es necesario demostrar que no producirá efectos nocivos, por esto se pretende detectar algún efecto indeseable en animales y evaluarlo para predecir la probabilidad de su aparición en la aplicación en humanos, debido principalmente a contaminación ocupacional que pudiera presentarse en personas que no fueron instruidos para el uso adecuado de estas sustancias.

La DL 50% funciona como un criterio de evaluación en el control de agentes, dicho parámetro puede ser aplicado a químicos individuales, mezclas simples y complejas, algunos biológicos y productos terminados como pesticidas y repelentes. Para tal efecto el presente trabajo evaluará la actividad tóxica *in vivo* de una solución humectable de esporas viables de tres cepas del género *Trichoderma*, que ha sido aplicado como fungicida, mediante la estimación de la dosis letal media en aplicación aguda y subcrónica (a 90 días) por las vías oral y tópica (dérmica).

Para los pesticidas que cuentan con agentes microbiológicos la seguridad y posibles riesgos en su uso puede depender del agente mismo, de su especificidad, modo de aplicación y de la geografía del área de aplicación, así refiriéndonos al cuadro de categorías de toxicidad usado por la EPA (Environmental Protection Agency) dicha solución se encontrará dentro de la categoría IV, las sustancias que se encuentran en esta categoría son clasificadas con un indicador de riesgo precautorio.

Los datos obtenidos en este trabajo servirán como base para datos toxicológicos requeridos en su registro como fungicida biológico, además, presentará una seguridad razonable en su uso, para minimizar los riesgos y efectos adversos que pudieran presentarse en el hombre.

I. INTRODUCCIÓN

El ser humano está expuesto a diferentes sustancias o agentes químicos y biológicos presentes en el ambiente, la forma en la que puede ingresar al organismo depende principalmente de la naturaleza del agente o sustancia y del medio en el que se encuentre, pudiendo abarcar más de una ruta de ingreso, una vez en el organismo pueden seguir diversos caminos.

Siempre que una sustancia es usada por el hombre, las primeras interrogantes son ¿Será peligroso?, ¿Causará algún daño?, ¿Qué tan segura es?, ¿Podrá producir la muerte?, etc., en general son cuestiones acerca de la toxicidad de tal sustancia, para lo cual se puede recurrir a datos toxicológicos reportados.

De manera tradicional, los datos toxicológicos obtenidos a partir de bioensayos con animales han sido usados para predecir los efectos adversos en los humanos, causados por la exposición a los agentes químicos y biológicos. La razón para utilizar animales de laboratorio es frecuente, los humanos no pueden ser utilizados para determinar el potencial tóxico, ni letal de los compuestos por razones de ética, seguridad, costo o tiempo. Inherente en el uso de los modelos animales está el hecho de asumir que los datos obtenidos son importantes para el hombre (Feron, 1990).¹⁹ A pesar del significativo avance actual de la metodología biológica, es un hecho que aún estamos lejos de tener un método ideal de cernimiento, el cual deberá ser simple y rápido, además lo suficientemente confiable. La CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y sustancias tóxicas) para el registro de plaguicidas microbiales requiere la presentación de resultados obtenidos en un primer nivel de pruebas, este nivel abarca pruebas de toxicidad aguda vía oral, dérmica y por inhalación en dos especies diferentes, donde al menos una sea especie roedora, para dar paso a un segundo nivel de pruebas toxicológicas en el que se incluye toxicidad subcrónica vía oral, dérmica y por inhalación.

En vista de las pruebas solicitadas el presente trabajo pretende estimar la toxicidad media de una solución humectable de esporas de *Trichoderma sp.*, utilizado como fungicida biológico en exposición aguda y subcrónica por vías oral y dérmica.

Debido al uso dado a la solución de humectable de esporas de *Trichoderma sp.*, se estima que la toxicidad para el hombre sea baja, es decir, presente una DL50% por encima de 5000 ppm, son tan sólo un riesgo para el hombre precautorio y mínimo riesgo para el medio ambiente, clasificando así dentro de la categoría IV según la EPA (Environmental Protection Agency).

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTORICOS DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

Mucha de la historia de toxicología y farmacología ha quedado anotada en escritos de medicina, así como en aquellas narraciones que tratan sobre envenenamientos, suicidios, asesinatos y ejecuciones. A pesar de este inconveniente podemos clasificar los escritos en tres etapas .

2.1.1. Etapa tradicional.

- Papiro Egipcio Ebers 1500 a.C.
- Trabajos escritos por Aristóteles, Hipócrates y Teofrastus donde se encontraron asentados venenos conocidos en aquellas épocas 400-250 a.C.
- Nicander, toxicología de venenos animales y antidotos para tóxicos de plantas y animales.
- Dioscorides, primer intento de clasificación de plantas de acuerdo con efectos terapéuticos, año 50 d.C.
- Galeno (131-200 d.C.) y Paracelso (1493-1541), primeros avances históricos de toxicología, establecimiento de la relación dosis- respuesta.
- M.J.B. Orfila (1787-1853) relevancia del análisis químico en los estudios de toxicología.
- Claude Bernard (1813-1878), propone el conocimiento de mecanismos de toxicidad.

(Hernández, 1998)²³

2.1.2. Etapa moderna.

Investigación de los mecanismos de acción bioquímica, aspectos forenses, industriales, bélicos y errores clínicos (1900-1945)

2.1.3. Etapa contemporánea

A partir de ahí la toxicología empieza a desarrollarse más científicamente incluyendo el estudio de mecanismos de acción, químicos y fisicoquímicos, intoxicaciones crónicas en poblaciones, contaminantes ambientales, mutágenos, enervantes, carcinógenos y teratógenos (Hernández, 1998).²³

2.2 TOXICOLOGÍA y FARMACOLOGÍA

Siendo la toxicología y farmacología los ramos de la ciencia en donde actuaremos, es necesario establecer sus definiciones .

2.2.1 Farmacología (*phármakon*; medicamento, *logos*: estudio), es la ciencia que estudia el perfil de la actividad lógica que poseen las sustancias, así como todo lo relacionado a su origen o fuente, constituyentes, propiedades físicas y químicas, efectos indeseables o deseables.

La farmacología esta implicada en la mayoría de las etapas de la investigación y desarrollo de "medicamentos", dando pie a la farmacología preclínica y clínica.

Farmacología preclínica es la etapa del proceso de desarrollo de nuevas sustancias que se realiza en animales de laboratorio y tiene como propósito fundamental: descubrir, evaluar y caracterizar las propiedades farmacológicas de las sustancias que pueden tener significado a nivel terapéutico, así mismo determinan los efectos colaterales y tóxicos a que puede dar lugar su administración (Goodman & Gilman, 2000).²¹

En general la farmacología abarca origen, propiedades físicas y químicas, asociaciones, efectos bioquímicos y fisiológicos, mecanismos de acción, absorción, distribución, biotransformación y excreción, usos terapéuticos o no, también, se refiere a las propiedades y efectos de los fármacos en un sentido general a las alteraciones de las sustancias y sistemas vivos, además de definir su actividad biológica.

La farmacología se divide en:

Farmacocinética: rama de la farmacología que se ocupa de la absorción, distribución, biotransformación y excreción.

Farmacodinamia: rama de la farmacología que se dedica al estudio de los mecanismos de acción (Katzung, 1994).²⁴

2.2.2 La toxicología (*toxicón, legein*) estudia las interacciones dañinas entre sustancias químicas y sistemas biológicos.

La toxicología tiene gran cantidad de campos de aplicación, la toxicología *descriptiva* abarca el desarrollo de pruebas toxicológicas (biológicas) en animales para producir mayor información en la evaluación del riesgo que se pueda extrapolar en seres humanos o el impacto ecológico, la toxicología *regulatoria* tiene la responsabilidad de decidir si un fármaco posee bajo riesgo para ser comercializado o usado legalmente, al igual que el área *ambiental* en la que se estudia el destino ambiental de sustancias químicas y sus impactos en los ecosistemas y poblaciones humanas (Hernández, 1998).²³

2.3 AGENTE TÓXICO

Como ya se mencionó tanto la farmacología como la toxicología se encargan de los efectos de las sustancias extrañas sobre un organismo

(incluso los medicamentos), por lo que es pertinente establecer algunas definiciones:

- *Xenobiótico*: sustancia extraña al ser vivo, no es producida por el organismo, incluye sustancias benignas o malignas. (Hernández, 1998).²³
- *Agente tóxico*: o sustancia tóxica aquella que tiene capacidad para producir un efecto tóxico (Rivero, 2001).³²

Los términos anteriores no deben tomarse en sentido absoluto, puesto que *“ todas las sustancias pueden ser venenos, su dosificación hace la diferencia para que se comporte como un veneno o un remedio” (Paracelso).*

Existen diferentes criterios de clasificación de los agentes tóxicos, los más utilizados son los que consideran:

1. La dosis letal media

No tóxico,
ligeramente tóxico,
muy tóxico, ...

2. Mecanismos de acción

unión a biomoléculas,
alteración de la homeostasis, ...

3. Órgano diana

Hígado,
Riñón, ...

4. Según su uso

Pesticida,
Aditivo de alimentos, ...

(Goodman & Gilman , 2000).²¹

2.4 CURVA DOSIS RESPUESTA

Uno de los conceptos que es necesario establecer, es la curva dosis respuesta, debido a su utilización como herramienta principal para este trabajo.

Para determinar la dosis de fármaco que se requiere para producir un efecto de magnitud especificada en un gran número de personas o animales experimentales, se gráfica la distribución de la frecuencia acumulativa de los sujetos estudiados contra el logaritmo de la dosis, dando origen a la curva dosis - respuesta. Puede elegirse el efecto todo o nada, o efecto cuantal especificado con base en la importancia clínica, o la preservación de la seguridad de los sujetos del experimento o puede ser un fenómeno cuantal (suceso optativo) inherente (por ejemplo: la muerte).

Para la mayoría de los fármacos las dosis necesarias para producir un efecto cuantal específico en los individuos son de distribución logarítmica normal, es decir, se obtiene una curva gaussiana de variación normal al graficar la distribución de la frecuencia de estas respuestas contra el logaritmo de la dosis. Al sumar estas respuestas la distribución de la frecuencia acumulativa resultante constituye una curva de dosis-efecto cuantal (Katzung, 1994).²⁴

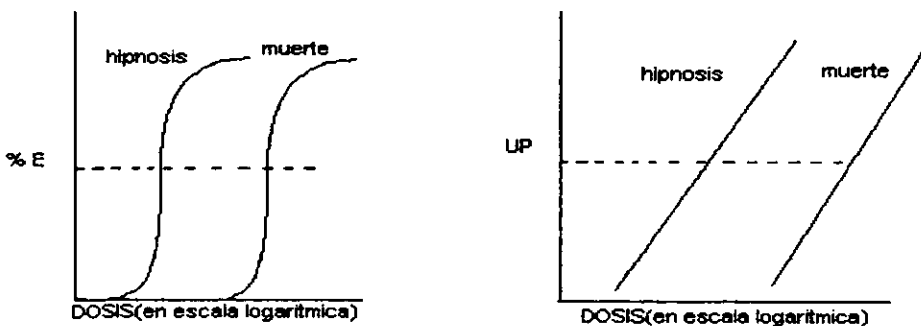


Figura 1. Curvas de distribución de dosis –respuesta de todo o nada

Esta curva da origen a diferentes parámetros toxicológicos como, dosis efectiva media (DE 50%), dosis tóxica media (DT 50%) y dosis letal media (DL50%), esta última se nombra a continuación.

2.5 DOSIS LETAL MEDIA

La dosis letal media (DL 50%), podemos definirla como la dosis necesaria para producir la muerte en el 50 por ciento de los animales de experimentación, así la dosis necesaria para producir un efecto tóxico particular en el 50% de los animales empleados se llama dosis tóxica media (Katzung, 1994).²⁴

Este parámetro es determinado generalmente por farmacólogos y da una idea preliminar de la toxicidad de la sustancia o tóxico, se calcula en forma experimental. La DL 50% se determina al trazar en la curva dosis respuesta (Figura 1) una vertical desde el punto de la línea en el cual la unidad probit (UP) es 5 del gráfico de unidades de desviación respecto a la media o probit en función de la dosis logarítmica (Goodman & Gilman, 2000).²¹

Diversos factores afectan la DL 50%, estos incluyen la especie o la cepa utilizada (Roman, 1990)³³, ruta y sitio de exposición, duración y frecuencia de exposición, para efecto de clasificación de las sustancias la EPA establece categorías de toxicidad que se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. CATEGORÍAS DE TOXICIDAD SEGÚN LA EPA.

Indicador de riesgo	I	II	III	IV
DL 50 oral	<50 mg/Kg ^a	50-500 mg/kg	500-5000mg/kg	≥5000 mg/kg
CL 50 inhalación	<0.2 mg/L ^b	0.2-2.0 mg/L	2.0-20 mg/L	≥20 mg/L
DL 50 dérmica	<200 mg/kg ^a	200-2000 mg/kg	2000-20000 mg/kg	≥ 20000mg/kg
Efectos oculares	corrosivo no reversible en 7 días	opacidad corneal reversible en 7 días, irritación persistente por 7 días	no opacidad corneal, irritación reversible en 7 días	No irritación
Efectos en la piel	corrosivo	severa irritación en 72 hrs	moderada irritación en 72 hrs	Ligera o nula irritación en 72 hrs.
riesgo toxicidad	peligroso alta	moderado media	precautorio media	Precautorio baja

^a dosis expresada como miligramos por kilogramo de peso corporal de los animales de prueba.

^b dosis expresada como miligramos por litro de aire.

(Bhushan, 1990; Hodosh, 1990)^{10,22}.

2.6 DURACIÓN Y FRECUENCIA DE EXPOSICIÓN.

Como ya se menciona en el párrafo anterior, la duración y la frecuencia son factores que intervienen en la exposición afectando directamente la DL 50%, para el estudio la duración a que un individuo se expone a una sustancia determinada, se ha dividido en varias etapas para el estudio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Etapas de exposición

exposición	Duración
aguda	menor a 24 hr
subaguda	menor a un mes
subcrónica	1-3 meses
crónica	mayor de 3 meses

(Rivero, 2001).³²

Así, la exposición aguda se produce cuando se administra la dosis una sola vez, la crónica señala el contacto o exposición a pequeñas cantidades de la sustancia por largo tiempo, lo cual genera una acumulación lenta en el organismo, evaluando así los efectos tóxicos acumulativos, sugiriendo la frecuencia de exposición (Goodman and Gilman, 2000).²¹

En base a estos antecedentes este estudio plantea determinar la DL 50% de sustancias con actividad plaguicida, por lo que se hace evidente establecer la definición de plaguicida y su clasificación.

2.7 PLAGUICIDAS

Son sustancias las cuales han sido diseñadas o seleccionadas en virtud de que presentan toxicidad selectiva para ciertos organismos.

Las razones para su estudio:

- pueden ser tóxicas para el hombre por intoxicación aguda o crónica
- pueden presentar efectos nocivos sobre organismos para los cuales no han sido designados.
- Pueden alterar el equilibrio ecológico y repercutir sobre flora y fauna.

(Hernández, 1998).²³

Los plaguicidas cuyo registro se sujeta al procedimiento indicado por el CICLOPAFEST, se clasifican en:

- A. Químicos: organofosforados, organoclorados, etc.
- B. Semioquímicos o infoquímicos: feromonas, alomonas etc.
- C. Microbiales: Bacterias, hongos, virus, nematodos protozoarios.
- D. Misceláneos: Botánicos, coadyuvantes, proteína hidrolizada y levadura tórula, jabones.

Entre los plaguicidas microbiales o microbiológicos que incluyen hongos como agente principal, encontramos la solución humectable de *Trichoderma sp.*, que a continuación se nombran sus generalidades.

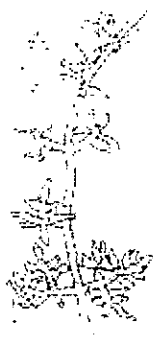
2.8 TRICHODERMA

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* sp.

Reino	Fungi
División	Deuteromycotina
Clase	Hypomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	Trichoderma

El género *Trichoderma* está caracterizado por micelio sumergido y aéreo aracnoide, esterado o lanoso. La conidiación es en forma de mechón expandido o pústulas compactadas de coloración inicial blanquizca que torna a verde olivo, gris y café. Los conidios presentan un eje principal amplio, recto o flexible con ramificaciones primarias levantadas en intervalos regulares formando ramas secundarias que también son ramificadas en los niveles apicales más altos. Las clamidosporas son abundantes en el micelio sumergido, se encuentran intercaladas en las ramas terminales de las hifas vegetativas. Las células conidiógenas (fiálides) usualmente están dispuestas en verticilos divergentes que terminan en ramas de conidióforos (De Paz, 1998).¹⁵

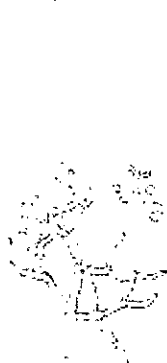
TRICHODERMA



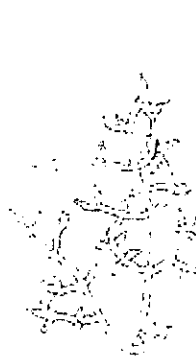
KONINGII



AUREOVIRIDE



VIRIDE



ATROVIRIDE

Figura 2. Algunas secciones incluidas en el género *Trichoderma*



Figura 3. Enrollamiento de *Trichoderma sp* sobre una hifa de *Rhizoctonia solani*.

Las especies agregadas del género son:

1. *Trichoderma pituliferum*
2. *Trichoderma polysporum*
3. *Trichoderma hamatum*
4. *Trichoderma koningii*
5. *Trichoderma aureoviride*
6. *Trichoderma harzianum*
7. *Trichoderma longibrachiatum*
8. *Trichoderma pseudokoningii*
9. *Trichoderma viride*

Estas especies para su desarrollo necesitan un alto porcentaje de compuestos de carbono y fuentes de nitrógeno. El carbono y los requerimientos de energía son obtenidos de monosacáridos y disacáridos, polisacáridos complejos, purinas y pirimidinas y aminoácidos.

Las especies del género *Trichoderma* son mohos verdes cosmopolitas, se les puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos de diversas zonas, están adaptados a diferentes condiciones ambientales y a eso se debe su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas-templadas y otras templadas-frías. Frecuentemente *Trichoderma spp* se presenta como un colonizador secundario en el material orgánico descompuesto, también, se encuentra en la superficie de las raíces de varias plantas y algunas veces es

posible encontrarlo en la corteza descompuesta, especialmente cuando ésta, está dañada por otros hongos.

También, se ha determinado que influyen en el desarrollo de *Trichoderma spp*, factores físicos y químicos como; pH del suelo, textura, concentración de CO₂ y HCO₃, contenido de sales, materia orgánica y presencia o ausencia de microorganismos en el suelo.

El género *Trichoderma* fue reconocido primeramente como antagonista de hongos fitopatógenos al actuar como micoparásito, competir por espacio, nutrientes y producir antibióticos volátiles y no volátiles, en estudios posteriores se han reportado sus efectos antagónicos en bacterias fitopatógenas, también se han registrado beneficios en el área de la medicina y su complejo enzimático es empleado en procesos alimenticios y de biodegradación (De Paz., 1998).¹⁵

2.9 Sulfato de cobre.

Dentro de la clasificación de plaguicidas químicos encontramos al sulfato de cobre pentahidratado, compuesto que describimos a continuación.

Compuesto químico, de fórmula $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, peso molecular 249.68 g/mol. La sal de cobre que cristaliza con cinco moléculas de agua, en forma de cristales triciclícos azules.

Se obtiene disolviendo óxido cúprico en ácido sulfúrico diluido, se encuentra en la naturaleza como mineral.

Soluble en etanol, glicerol y agua (32/100 partes), ligeramente soluble en metanol, punto de fusión (-5H₂O) 150°C, DL 50% oral en ratas 960 mg/kg.

Se usa en forma de lápiz para curar úlceras y verrugas, en solución contra el tracoma, como emético y como **fungicida, plaguicida**, bactericida y herbicida en la agricultura (Merk Index, 1996).³¹

Los efectos que han presentado por la exposición a este compuesto son irritación e inflamación de la piel, así como del tracto respiratorio y ojos. Es corrosivo para membranas mucosas y córnea. La ingestión produce vómito, dolor urente en boca, esófago y estómago, dolor abdominal con típico cólico y diarrea que en ocasiones se acompaña de sangre, cefalea, transpiración, debilidad, anuria, lesión hepática y convulsiones.

Existen múltiples presentaciones comerciales para su uso como fungicida:

Blue viking	Boullie	Coopertryl
Cuper Quim	Phyton-27	Sulfocobre
Sulfacob-25	Calfacop	Sulfato Tribásico de cobre
Sulfato Tribásico de cobre técnico		Sulfato de cobre pentahidratado
Triangle	Tribacu	Tricobre Dragon
Comet y/o Vitacob sulfato de cobre pentahidratado		

Entre tantos productos en el mercado es lógico pensar que la ingestión accidental y el contacto con alguna de estas presentaciones ha sido posible por lo que el tratamiento a seguir es lavar la piel con abundante agua y jabón. Enjuagar los ojos con agua o solución salina. Administrar leche o agua para diluir el tóxico. Si el vómito aún no se ha presentado o no ha sido vigoroso, realizar lavado gástrico. Posteriormente aplicar carbón activado, en adultos 50-100 g seguido de 2-3 vasos con agua, en niños de 15-30 g también seguido por la ingestión de agua. Administrar líquidos intravenosos que contengan glucosa y electrolitos. Monitorear plasma para buscar hemólisis (Rivero, 2001).³²

En base a su utilidad y a su DL 50% esta sustancia será utilizada como control positivo (+).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 JUSTIFICACIÓN

En vista de la gran cantidad de sustancias que se producen, de su utilización en la producción de alimentos en especial los pesticidas, y su extremada toxicidad, a riesgo de contaminar el medio ambiente y contraer enfermedades, es innegable la necesidad de discernimiento de los datos toxicológicos de los insumos utilizados, por ello este trabajo pretende estimar de los datos toxicológicos.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Estimación *in vivo* de la dosis letal media (DL 50%) en exposición aguda y subcrónica por vía oral y dérmica, de una solución humectable de esporas viables de *Trichoderma sp.*, utilizado como fungicida biológico.

3.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seguir los lineamientos mencionados en el ASTM ^{3ss}, para determinación de toxicidad.
- Realizar buenas prácticas de laboratorio.

Los datos obtenidos servirán como base en el registro de este fungicida como plaguicida microbial.

3.3 HIPÓTESIS

Si la estimación de la DL 50% de la solución humectable de *Trichoderma sp.* es mayor de 5000 ppm, entonces así se clasificará dentro de la categoría IV de toxicidad de acuerdo al cuadro 1 (Bhushan, 1990; Hodosh, 1990).^{10,22}

3.4 ENSAYOS

Para demostrar nuestra hipótesis y alcanzar los objetivos recurriremos a las siguientes pruebas:

- A) Ensayo en *Artemia-salina* L.
- B) DL 50% aguda, vía oral
- C) DL 50% aguda, vía dérmica
- D) DL 50% subcrónica, vía oral
- E) DL 50% subcrónica; vía dérmica

IV. ENSAYO DE *Artemia salina*

El empleo de ensayos biológicos consiste en la determinación del efecto biológico de una sustancia sobre un organismo y constituye la estrategia más apropiada para el ensayo de materias primas idóneas de uso farmacéutico, alimenticio o agrícola. En la literatura se describen un número suficientes de técnicas de bioensayos inespecíficos o específicos; simples o complejos que permiten realizar desde un examen biológico preliminar hasta los estudios biodirigidos.

Entre las evaluaciones biológicas de carácter general destaca por su sencillez y economía la prueba del crustáceo *Artemia salina* Leach.

Los efectos biológicos y fisiológicos observados son críticos, una de las respuestas biológicas simples es el monitoreo de la letalidad. Un procedimiento general de discernimiento de toxicidad que no requiere mucha especialización es tomar el criterio de muerte o vida. Combinado con una referencia de compuestos, el ensayo con *Artemia salina* es rápido, simple, poco costoso y reproducible.



Figura.4. Larva de *Artemia salina* L. y adulto respectivamente.^{38,39}

El crustáceo *Artemia salina* pertenece a la subclase Branchiopoda, orden Anostraca, tiene una alta tolerancia a rangos de salinidad concentrada, sus huevecillos son altamente resistentes a condiciones extremas por largos periodos de tiempo, se reproduce ovíparamente y/o vivíparamente, es dependiente de oxígeno y de luz (Teng Wah, 1993).³⁸

4.1 Objetivo

Determinación de la toxicidad de una solución humectable de *Trichoderma sp.* en *Artemia salina*.

4.2 Hipótesis

En el ensayo de toxicidad en *Artemia salina* Leach la estimación de DL50% de la solución humectable de *Trichoderma sp.* es mayor a 1000 ppm, se establece un nivel de riesgo precautorio (categoría III) de acuerdo al cuadro de criterios de toxicidad para pesticidas del cuadro 1.

4.3 Material

Lámpara portátil de 60 Watts

Pipetas Pasteur con bulbo

Frascos viales y/o gerber

Balanza granataria, marca OHAUS

Matraz Erlenmeyer de 25 mL

Incubador, 25°C +/- 2°C, marca Ultratec Española (10-40°C)

Huevecillos de *Artemia salina*, marca OHUIRA, Técnica Acuamarina.

Esporas de *Trichoderma sp.*

Agua destilada o purificada, distribuidor Gueeson-Velarde

Glicerina grado USP, marca Fabrica de jabón LA CORONA S.A.

Medio salino INSTAN-OCEAN, marca AQUARIUM SYSTEM, 19 Lts.

Sulfato de cobre pentahidratado, marca SULFACOB 25

composición %	% peso
CuSO ₄ * 5H ₂ O	mayor igual a 98.23
impurezas	menor igual a 1.77
total	100.0 g

4.4 Desarrollo experimental

- Los huevecillos del crustáceo *Artemia salina* L ,se incuban durante 48 horas en un medio salino artificial, previamente oxigenado.
- Pesar 8 g de sulfato de cobre, verterlo en un matraz Erlenmeyer de 25 mL, de esta solución se transfiere 1 mL a un matraz de 25 mL de este, transferir 2 mL a un frasco (por triplicado).
- Transferir de esa misma solución 0.2 mL y colocarlo en un frasco (por triplicado), de esta solución tomar 5 mL y verterlo en otro matraz Erlenmeyer aforar a 25 mL.
- Tomar 1 mL aforarlo a 25 mL, tomar tres frascos y colocar en cada uno de ellos 2.5 mL de esta última solución.
- En otros tres frascos colocar 0.25 mL de esta última solución.
- * Dejar evaporar el disolvente a sequedad, a temperatura ambiente o al vacío. Posteriormente se transfieren 10 larvas del crustáceo a cada uno de los viales, se afora con 5 mL de medio salino.
- De esta manera se obtienen concentraciones finales del control positivo de 5120 µg/mL, 512 µg/mL, 52 µg/mL, 5.2 µg/mL .
- Para el control negativo pesar 1 g de glicerina, verterlo en un matraz de 25 mL, transferir 1 mL a un frasco (por triplicado) y otro mL a un matraz de 25 mL de ahí transferir 1.6 mL a un frasco (por triplicado) otro mL de este último matraz transferir 1 mL a otro matraz de 25 mL del cual se transferira por ultimo otro mL a un frasco (por tiplicado), aforar con agua y seguir el paso anterior (*)
- De esta manera se obtienen concentraciones finales de control negativo de 4000 µg/mL, 160 µg/mL, 12.8 µg/mL.

- Para la solución humectable de *Trichoderma sp.* pesar 625 mg de esporas, colocarlos en un matraz de 25 mL, aforar con solución de agua-glicerina 1:1 de esta solución transferir 4 mL, 2 mL, 1 mL a un frasco (por triplicado) y 5 mL a un matraz de 25 mL.
- De este matraz transferir 1 mL a un frasco (por triplicado) y 2.5 mL a otro matraz de 25 mL de este se transferirá 1 mL a un frasco (por triplicado) seguir el paso(*)).
- De esta manera las concentraciones finales de la solución de *Trichoderma sp.* serán de 10000 µg/mL, 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 500 µg/mL, 50 µg/mL y 2 µg/mL.
- Los frascos se mantienen con iluminación artificial durante 24 hrs, transcurrido el tiempo se procede a contar el número de crustáceos sobrevivientes.
- El cálculo de la concentración letal media (DL 50%) se realiza de acuerdo a la metodología descrita en la literatura. (Teng Wah, 1993).³⁶

4.5 Resultados y discusión.

En el desarrollo del método se observó que a partir de la solución de *Trichoderma sp.*, correspondiente a 2500 ppm esta fue turbia y conforme aumentaba la dosis de *Trichoderma* las soluciones preparadas eran más turbias, por lo que el paso de la luz disminuyó considerablemente en los frascos, recordemos que los crustáceos de *Artemia salina* son dependientes de luz, situación semejante se observó con las soluciones del control positivo a partir de la solución de 5000 ppm.

En cuanto a los resultados (Cuadro 4. Resultados de *Artemia salina* vs *Trichoderma sp.*), podemos observar que el porcentaje de mortalidad del control negativo es de 30% con una dosis de 4000 ppm (Gráfico 4. Control negativo para el ensayo de *Artemia salina* L) la que se observa muy alta en comparación

con lo reportado en la literatura (mayor de $125 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$), también se observa que debió prepararse una solución de un orden menor a 12.8 ppm para así poder comparar los datos obtenidos de las soluciones del control positivo y de *Trichoderma sp.*

En lo referente al control positivo se observa DL 50% de 2884 mg/Kg del gráfico 2, mientras que en la literatura se reporta de 960 mg/Kg, observándose una tendencia a la baja contraria a la observada con el control negativo y *Trichoderma*, se observa la mortalidad de este control de 55% hasta de 5120 mg/Kg.

Siguiendo con los datos arrojados con la solución de *Trichoderma* estos no pueden ser evaluados fidedignamente a partir de 2500 ppm debido a que las condiciones en el crecimiento de *Artemia salina* después de la aplicación de la solución humectable no fue el óptimo, por lo que no podemos decir que el efecto observado (muerte) fue influido sólo por la toxicidad de la solución de *Trichoderma*, otro punto es necesario mencionar es que con tan solo 500 ppm se tiene mortalidad del 30%, la cual es alta a lo esperado, sin embargo de la Figura 6. *Trichoderma sp* para el ensayo *Artemia salina*, se obtiene 1096 ppm como DL 50%.

Por lo anterior, los resultados de este experimento no son confiables, se sugiere la aplicación de otro ensayo biológico.

Gráfico 1. Relación dosis - organismos acumulados del control negativo en *Artemia salina*.

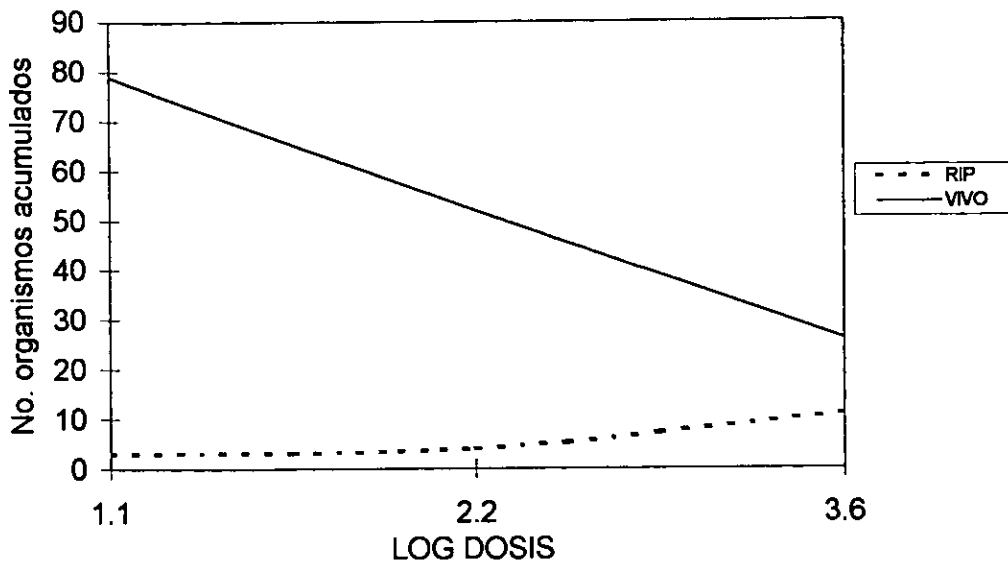


Gráfico 2. Relación dosis - organismos acumulados del control positivo en *Artemia salina*.

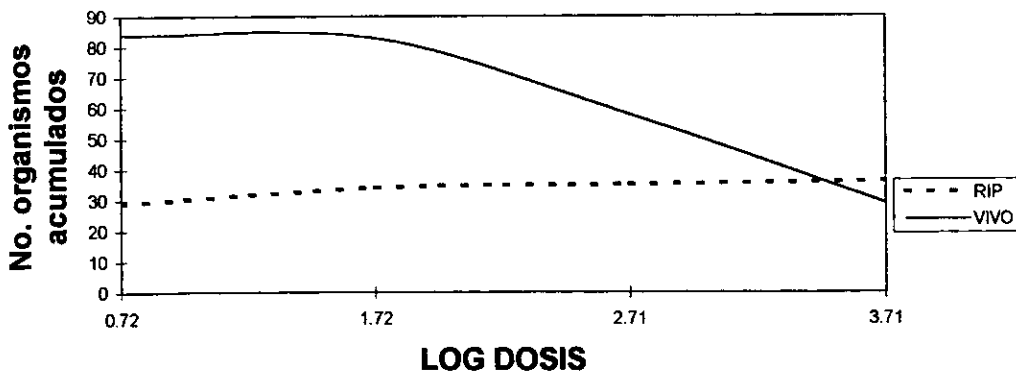
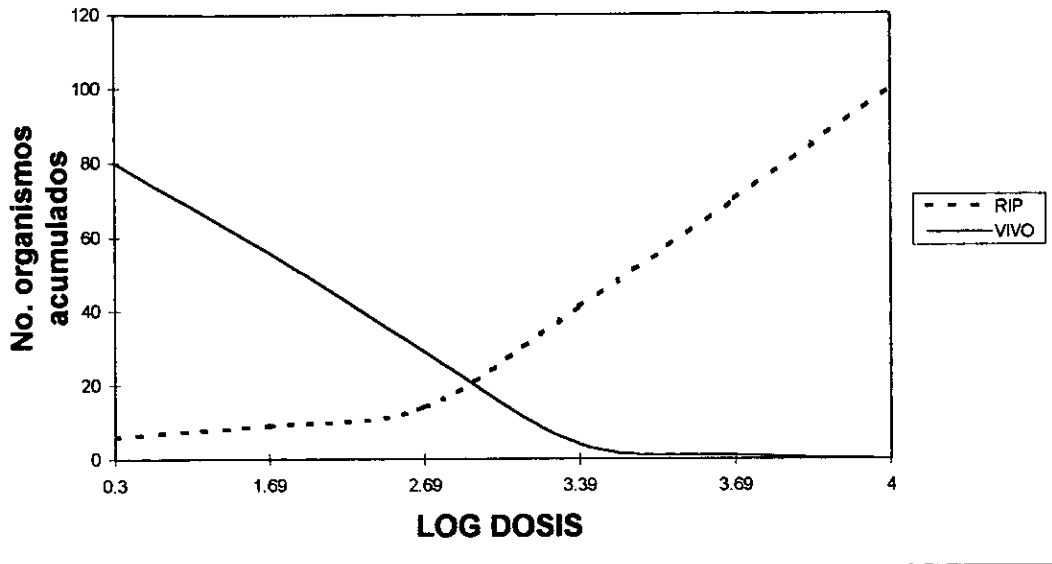


Gráfico 3. Relación dosis - organismos acumulados de *Trichoderma* sp en *Artemia salina* .



V. DL 50% aguda.

5.1 Modelos animales

En cada estudio se asume el uso de modelos animales apropiados, estos estudios requieren especies roedoras y no roedoras. Sin embargo, los estudios en animales presentan dos problemas; el primero es la diferencia entre especies; el segundo concierne a las diferencias en las condiciones bajo las cuáles los xenobióticos son administrados (Melby, 1983)³⁰. Así un modelo biomédico es un animal o un sistema inanimado alterno, que simula o predice acerca de un proceso o condición biomédica (Soriano, 1997)³⁵.

Un modelo biomédico debe satisfacer los siguientes criterios:

1. Debe ser posible y reproducible o predecir procesos biomédicos o condiciones biomédicas.

2. Debe estar disponible o al menos producible, para que el investigador obtenga fácilmente datos que puedan tener utilidad estadística y validar la investigación.

3. El modelo debe ser económico en su obtención y en su desarrollo.

4. Si se utiliza un modelo inanimado este debe ser fácil de manejar y de cuidar, también de ser económico y con el menor equipo posible.

5. Debe contar con una amplia base de información que permita establecer comparaciones de los datos nuevos que apoyen la exactitud, la especificidad y la validez del modelo.

De lo anterior se deriva el refinamiento de los procesos para disminuir el estrés o el dolor a los animales y reducción del número de animales a utilizarse, hasta el mínimo, que servirá o que tendrá utilidad para el propósito. (Soriano, 1997)³⁵.

Es conveniente revisar, aunque sea en forma breve, las características biológicas y fisiológicas esenciales de la especie utilizada en el laboratorio.

Hay dos especies comunmente usadas en el laboratorio *Rattus rattus* o rata negra y la rata albina o noruega *Rattus norvegicus*, desarrollada a partir de la rata silvestre Norvegica. Actualmente, existen varias cepas de ratas consanguíneas y poblaciones no consanguíneas, es más común la utilización de estas últimas.

Cuadro 5. Taxonomía de la rata (Baker, 1979)⁹.

Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Infraclase	Eutheria
Orden	Rodentia
Suborden	Myomorpha
Superfamilia	Muroidea
Familia	Muridae
Subfamilia	Murinae
Género	<i>Rattus</i>
Especie	<i>norvegicus</i>
Origen	Asia (viejo mundo)

Los tres tipos de ratas no consanguíneas más comúnmente utilizadas en la investigación son;

a. Wistar (WI) esta es una rata albina desarrollada en el Instituto Wistar de Philadelphia. Tiene cabeza ancha, orejas relativamente grandes y comportamiento dócil, la cola es mucho más corta que el resto del cuerpo;

b. Sprague-Dawley (SD). Originalmente producida por la granja Sprague-Dawley en Madison Wisconsin, es una rata albina más pequeña y de más rápido crecimiento que la Wistar. Tiene cabeza larga, fina y estrecha, su cola es del mismo tamaño que el resto del cuerpo; sumamente prolífica, más sensible a enfermedades respiratorias.

c. Long-Evans (LE) esta rata es mucho más chica que la Wistar o la Sprague-Dawley. Su cuerpo es blanco y está cubierto por parches negros, su cabeza es usualmente negra. Debido al color negro de la cabeza "capucha" a este animal también, se le denomina rata encapuchada. Son ratas muy activas y de comportamiento muy agresivo (Gómez, 1999; Soriano, 1997)^{20,37}

Cuadro 6. Parámetros generales de la rata albina

peso	macho	250-300 g
	hembra	250-300 g
	al nacer	5-6 g
tamaño corporal	+/- 5	37.5 cm
frecuencia respiratoria		92 (80-150) min
frecuencia cardiaca		350 (260-450)min
edad		10-12 sem
comportamiento de cruce		poligamo 1:6
temporada		todo el año
ciclo estral		poliestrico
duración		4-5 días
gestación		21 (20-22) días

camada		7-14 individuos
destete		21 días, 40-50g
recruza		inmediatamente
área de alojamiento	<150g	150cm ²
	>150g	250 cm ²
altura de alojamiento	<150 g	180 cm
	>150 g	20cm
temperatura		12-28 °C
humedad relativa		40-70%
requerimiento de luz		12-14 hrs/día
consumo de agua	ad libitum	20-45 mL
consumo alimento	ad libitum	12-20g

5.2 Estimación de dosis letal media aguda, vía oral

Para tal efecto se puede elegir el efecto cuantal especificado con base en la relevancia clínica o la preservación de la seguridad de los sujetos de experimentación, o puede ser un fenómeno inherente. Para casi todas las sustancias las dosis que se necesitan para producir un efecto cuantal especificado en un individuo generalmente tiene una distribución logarítmica normal, así cuando se tiene la distribución de la frecuencia acumulada se puede construir una curva cuantal de dosis efecto.

La curva cuantal se caracteriza por enunciar la dosis efectiva media (DE 50%), dosis tóxica media (DT 50%) , dosis letal media (DL 50%) definida en la sección 2.5. Así la DL 50% funciona como un criterio de evaluación en el control de agentes vertebrados. Puede ser aplicado a químicos individuales, mezclas simples, complejas, agentes bioquímicos, agentes microbiológicos y productos terminados como pesticidas, repelentes.

5.2.1 Objetivo

Estimación de la toxicidad aguda, vía oral (DL 50%) en ratas.

Observación de las alteraciones que presenten los roedores en un lapso de 14 días.

5.2.2 Hipótesis

Si la DL 50% de la solución humectable de *Trichoderma sp*, por aplicar es mayor o igual a 5000 ppm, entonces representará un nivel de riesgo precautorio (categoría IV), de acuerdo al cuadro de criterios de toxicidad para pesticidas. (Cuadro 1).

5.2.3 Material

Jeringas de 5 mL, marca plastipak

Balanza granataria, marca OHAUS

Marcadores de colores, marca Esterbrook

Sonda para alimentación infantil, marca Kortex, catálogo K-731-C

Reloj con cronómetro.

Ratas albinas, cepa Wistar, adultos jóvenes machos, peso 280g -340g

Solución de *Trichoderma sp*, marca LITHAN

Sulfato de cobre pentahidratado, marca SULFACOB 25

composición %	% peso
CuSO ₄ *5H ₂ O	mayor igual a 98.23
impurezas	menor igual a 1.77
total	100.0 g

Agua destilada o purificada, distribuidor Guesson-Velarde

Glicerina grado USP, marca Fábrica de jabón LA CORONA S.A.

5.2.4 Desarrollo experimental

1. Mantener los animales en periodo de aclimatación durante 5 días.
2. Tomar cada rata, pesarlas y distribuir las, etiquetando cada una de ellas.
3. Calcular la dosis aplicable según su peso (Cuadro 7).
4. Administrar la solución de *Trichoderma sp.*, vía oral, con sonda esofágica.
5. Después de la administración observar continuamente en intervalos de 1 hr, durante un periodo de 6 hr (Adbel-Barry, 2000)², después cada 24 hr durante 14 días (ASTM, 1999)^{3,4,6}.
6. A cada intervalo de tiempo anotar todas las alteraciones físicas observables en las ratas como incremento o decremento de la respiración, hipoactividad, ataxia, diarrea, letargia, secreciones rojas de los orificios del cuerpo y sus contenidos.

5.2.5 Peso y cálculos.

Solución de <i>Trichoderma sp</i>	4.22x10 ⁸ esp/mL	65.41mg/mL
Solución de <i>Trichoderma sp</i>	3.43x10 ⁹ esp/mL	531.65mg/mL
Solución de CuSO ₄ *5H ₂ O	-	1000mg/mL

Cuadro 7. Relación de pesos y volumen por administrar para DL50% aguda, vía oral.

tratamiento	rata	peso(g)		mL admon
C(-)	verde I	256.9	0.1mL/100g	0.256
C(-)	verde II	246.7	0.1mL/100g	0.246
C(-)	verde III	266.9	0.1mL/100g	0.266
tratamiento	rata	peso(g)	dosis	mL admon
C(+)	rojo II	348	2500 ppm	2.2
C(+)	verde II	368.4	2500 ppm	2.2
C(+)	verde III	364.6	2500 ppm	2.2

5100	azul III	313.5	132200 ppm*	6.5*
9000	negro V	250.9	8988 ppm	4.19
8900	cafe V	261.4	8934 ppm	4.15
1174	negro I	233.3	1174.7ppm	5.3
1174	negro II	231.1	1174.6 ppm	4.19
1174	negro IV	267.3	1174.0ppm	4.81
588	azul I	249.7	586.74ppm	2.24
588	azul IV	250.2	588.21ppm	2.25
588	azul V	269.8	586.7ppm	2.42
292	rojo I	268.7	292.11ppm	1.20
292	rojo II	255.4	332.8ppm	1.14
292	rojo IV	242.9	293.5ppm	1.09

Cálculo;

Dosis por administrar (ppm, mg/kg); Por ejemplo 9000ppm

9000mg - 1000g

X1 - peso rata (250.9g)

X1 =2258.1mg

Concentración de la solución 531.65 mg -1 mL

2258.1 mg - X2 =4.20 mL por administrar

5.2.6 Resultados y Discusión.

Los resultados se muestran en el siguiente cuadro;

Cuadro 8. Resultados obtenidos de los grupos control,
para DL 50% aguda via oral.
relación % efecto

GRUPO	efecto	toxicidad	muerte	efecto	toxicidad	muerte
control (+)	3/3	2/3	3/3	100%	66.67%	100%
control (-)	0/3	0/3	0/3	0%	0%	0%

Los datos donde n es igual a 3 se refiere al número de animales de experimentación establecidos de acuerdo a los estudios de Lorke, 1983²⁸.

Del cuadro anterior (Cuadro 8.) se observa claramente el grupo control negativo no presenta efectos tóxicos con lo que se confirma que el solvente utilizado en la preparación de la solución de *Trichoderma* no ocasiona efectos tóxicos intrínsecos, que puedan potenciar la toxicidad de las esporas de *Trichoderma*. El control positivo (sulfato de cobre pentahidratado) sí muestra efectos tóxicos de nuestro interés (letalidad) con lo que se tiene una referencia de los efectos que se pueden presentar, y de como podría presentarse, no dejando de lado la variabilidad que se presenta entre un individuo y otro. Es importante mencionar que en el grupo control todos los individuos de prueba debían morir, confirmando así que su DL 50% es de 472 mg/kg.

En lo referente a la solución de *Trichoderma* los datos presentados en el cuadro 9, son resultados de DL50% aguda vía oral y conforman los gráficos 4 y 5 en los cuales se observa que la curva representativa de letalidad no cruza por la línea media con lo cual no se puede estimar la DL 50 sin embargo, una DL menor (30%, 40%) podría ser estimada. De estas mismas figuras se puede calcular la DE50% y DT50%. La DE50% coincide en ambos gráficos calculándose en 812.83 mg/kg, sin embargo esta dosis no corresponde a su eficiencia sobre agentes patógenos en plantas, el efecto mínimo observado en los animales de experimentación fue la piloerección. Mientras que para la toxicidad se observa a los animales aletargados así, la DT50% se calcula en el orden de 1000 mg/Kg observándose que se encuentra dentro de la categoría III de toxicidad con un riesgo precautorio (Hodosh, 1990)²², recordemos que la dosis tóxica media es aquella dosis a la cual el 50% de los individuos presentan un efecto tóxico cualquiera que este sea.

Un punto que es necesario mencionar es la dosis real aplicada a una rata del grupo de 8960 ppm, esta es de 13,200 ppm lo que indica un orden mayor de *Trichoderma sp*, sin presentarse aún así letalidad, esto podría indicarnos un nivel de toxicidad muy bajo, sin embargo, tendría que montarse un experimento nuevo para su cálculo exacto.

Cuadro 9. Resultados para DL 50% aguda, vía oral para Trichoderma sp.

282	2.47	0/3	0/3	0/3	0	0	0	3.62	3.62	3.62
586	2.77	0/3	0/3	0/3	0	0	0	3.62	3.62	3.62
1174	3.07	3/3,	2/3,	1/3,	100	66.67	33.33	6.38	5.34	4.57
2250	3.95	3/3,	2/3,	0/3	100	66.67	0	6.38	5.34	3.62

para 0% n=3

$$(0.25/n) * 100$$

$$(0.25/3) * 100$$

$$8.33$$

UP para 8 3.595
UP para 9 3.659

$$3.659 - 3.595 = 0.064$$

$$3.595 + 0.021 = 3.62 \text{ UP}$$

X1 0.064 1
X1 = 0.021 0.33

para 100% ||
(n-0.25/n)*100
(3-0.25/3) *100
91.67

UP para 91.6 6.379
UP para 91.7 6.385

$$6.385 - 6.379 = 0.006$$

$$6.379 + 0.00402 = 6.38 \text{ UP}$$

X2 0.006 0.1
X2 = 0.067 0.067
X2 = 0.00402

continuación de cálculos de UP
para 66.67%

UP para 66	5.413	5.440-5.413 =0.027	5.413+0.18 =5.43 UP
UP para 67	5.44		
		0.027	
		1	
	X3	0.67	
	X3=0.018		
para 33.33 %			
UP para 33	4.56	4.587-4.560 =0.027	4.560+0.00891 = 4.57 UP
UP para 34	4.587		
		0.027	
		1	
	X4	0.33	
	X4=0.00891		

DE LOS GRÁFICOS 4 Y 5 TENEMOS:



DL50 %	-	
DT50%	812.83	DONDE LA TOXICIDAD SE OBSERVAN LOS ANIMALES ALETARGADOS
DE50%	1000	DONDE EL EFECTO ES LA PILOERRECCION

Gráfico 4. Relación porcentaje - dosis para DL 50% aguda, vía oral para Trichoderma sp.

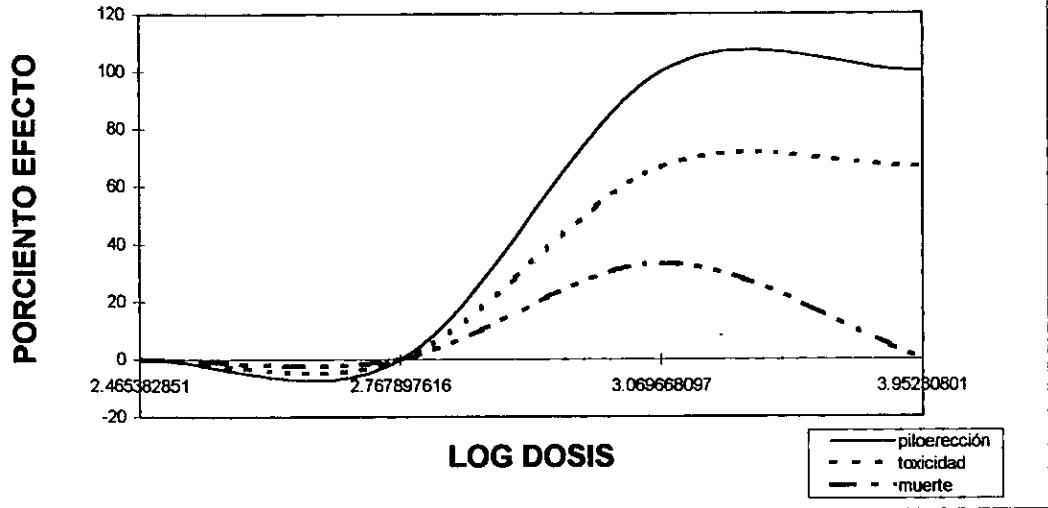
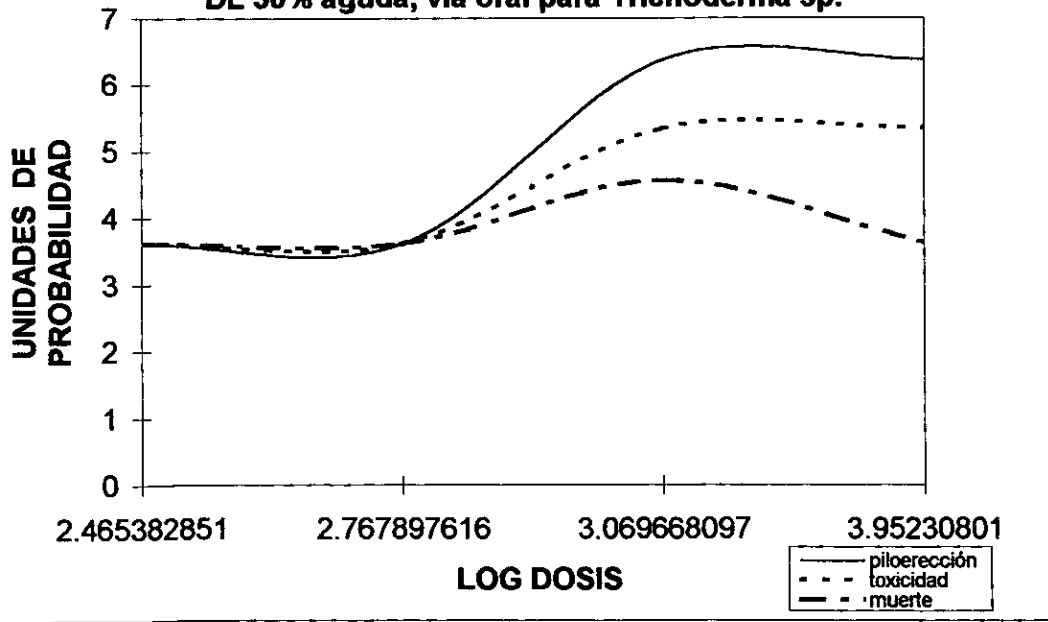


Gráfico 5. Relación unidades de probabilidad - dosis para DL 50% aguda, vía oral para Trichoderma sp.



5.3 Estimación de la dosis letal media aguda, vía dérmica.

En este ensayo se evaluaron las características tóxicas para asignar efectos letales y subletales de la sustancia aplicada sobre la piel en una sola exposición.

Esta prueba es requerida para productos manufacturados y formulados, un estudio inicial puede llevarse a cabo con una sola dosis, si los resultados indican que la DL 50% en 24 hr es mayor a 20 g/kg de peso, no se requiere otro estudio.

Si no es así es necesaria una prueba más formal, esta prueba puede ser usada como estudio inicial de toxicidad en la piel. Algunas limitaciones prácticas como el área superficial del animal de experimentación que es expuesta y el tiempo de exposición, pueden dar origen a datos semicuantitativos, sin embargo, los datos generados permiten una estimación razonable del nivel de riesgo en el humano. Por lo cual también se eligió el efecto cuantitativo (ASTM, 1999)^{4,5}.

5.3.1. Objetivo

Estimación de la DL50% y DT 50% aguda, vía dérmica en ratas.

Observación de las alteraciones que presenten los animales de prueba en un lapso de 14 días.

5.3.2 Hipótesis

Si la DL 50% vía dérmica de la solución humectable de *Trichoderma sp.* por aplicar es mayor a 9000 ppm entonces, representará un nivel de riesgo precautorio (categoría III), de acuerdo al cuadro de criterios de toxicidad para pesticidas (Cuadro 1).

5.3.3 Material

Balanza grantaria, marca OHAUS

Marcadores de colores, marca Esterbrook

Aspersor

Reloj con cronómetro

Isopos de algodón o gasa absorbente

Rasuradora, marca Trimer ES-505

Tijeras para estilista, marca Barrilito

Ratas albinas, cepa Wistar, adultos jovenes machos

Solución de *Trichoderma sp*, marca LITHAN

Sulfato de cobre pentahidratado, marca SULFACOB 25

composición %	% peso
CuSO ₄ *5H ₂ O	mayor ifual a 98.23
impurezas	menor igual a 1.77
total	100.0 g

Agua destilada o purificada, distribuidor Guesson-Velarde

Glicerina grado USP, marca Fabrica de jabón LA CORONA S.A.

5.3.4 Desarrollo experimental

1. Mantener a los animales en periodo de aclimatación durante 5 días.
2. Tomar cada rata y pesarla, etiquetar cada una de ellas.
3. Eliminar el pelo del dorso de la rata con la rasuradora, si es necesario tres días antes de la aplicación (Un área aproximada de 4 x4 cm) .
4. Verificar que la piel del animal no se encuentre lesionada (irritación, heridas, escoriaciones, inflamación...) y que se encuentre en estado saludable
5. Calcular la dosis aplicable según su peso y tratamiento correspondiente

6. Administrar la sustancia según el tratamiento correspondiente, vía dérmica por aspersión, si es necesario, mediante los isopos o la gasa absorbente cerciorarse que toda el área de aplicación este humedecida con la sustancia correspondiente.
7. Después de la aplicación observar continuamente en intervalos de 1 hr durante un periodo de 6 hr (Abdel-Barry, 2000)², posteriormente realizar observaciones cada 24 hr durante 14 días (ASTM, 1999)⁵.
8. En cada intervalo de tiempo anotar las alteraciones físicas observables en los individuos.

5.3.5 Peso y cálculos.

Solución de <i>Trichoderma</i>	4.22x10 ⁸ esp/mL	65.41 mg/mL
Solución de <i>Trichoderma</i>	3.43x10 ⁹ esp/mL	531.65 mg/mL
Solución de CuSO ₄	200 mg/mL	

Cuadro 10. Relación peso-volumen por administrar para DL 50% aguda, vía dérmica.

Tratamiento	rata	peso(g)		mL admon
C(-)	cafe I	428	0.5g/kg	2.1
C(-)	cafe II	424.1	0.5g/kg	2.1
C(-)	negro IV	385	0.5g/kg	1.9
Tratamiento	rata	peso (g)	Dosis	mL admon
C(+)	azul I	371.8	1000 ppm	1.8
C(+)	azul II	363.8	1000 ppm	1.8
C(+)	azul V	367.7	1000 ppm	1.8
9000	rojo I	351	9000 ppm	5.9
9000	rojo III	350.2	9000 ppm	5.9
9000	rojo IV	386.8	9000 ppm	6.5

2400	cafe III	383.4	2400 ppm	1.7
2400	azul IV	391.5	2400 ppm	1.8
2400	rojo V	375.6	2400 ppm	1.7
1200	verde I	353.9	1200 ppm	0.8
1200	verde II	396.2	1200 ppm	0.8
1200	verde III	323.3	1200 ppm	0.8
600	negro I	295.6	600 ppm	2.7
600	negro II	327.7	600 ppm	3.0
600	negro III	244.8	600 ppm	3.1

Cálculo;

Dosis por administrar (ppm, mg/kg); Por ejemplo 600 ppm

600 mg -1000 g

X1 - 295.6 g

X1 = 177.36 mg

Concentración de la solución 65.41 mg - 1 mL

177.36 mg - X2 = 2.7 mL

5.3.6 Resultados y discusión

Observando el cuadro 11, se verifica que el control negativo, no produce efecto alguno sobre la piel de los animales experimentales, siendo este control el disolvente de la solución de *Trichoderma sp.*, con lo que podemos decir que no produce efectos tóxicos intrínsecos y que no potencia el efecto tóxico que la solución de *Trichoderma* pueda tener.

En relación al control positivo, se observa en todo el grupo de animales experimentales que presentan efectos tóxicos, como se observan en las Figuras 5 y 6, sirviendo como referencia del efecto tóxico y su magnitud. Si hay lesión, el animal presenta lo siguiente:

- * piloerección de la piel en el área de aplicación,
- * acumulación de la sustancia en el área aplicada,
- * irritación,
- * presencia de una pequeña roncha (que el mismo animal se puede rascar),
- * mayor irritación e inflamación,
- * lesionando la piel ocasionando pequeños sangrados que se encostran.

De lo anterior decimos que el efecto mínimo presentado es piloerección de la piel en el área aplicada, y el efecto tóxico es: irritación, inflamación y formación de la costra. En cuanto a magnitud los resultados arrojan que la roncha se presenta alrededor del tercer día, mientras que la irritación e inflamación al cuarto día y la costra aparecerá en promedio al sexto día, teniendo una duración hasta el noveno día como mínimo.

En lo referente a la solución de *Trichoderma sp*, en los gráficos 6 y 7, se ven resultados semejantes para el efecto mínimo presentado, puesto que todos los animales lo manifestaron, sin embargo no se hace referencia si fue al mismo intervalo de tiempo en cuanto a magnitud. La letalidad no se presenta en ningún grupo tratado por lo cual, la curva permanece en el origen, sugiriendo así la observación de la curva de toxicidad; esta si se eleva para interpolar y calcular una DT 50%, sin embargo, el efecto de toxicidad no es de igual magnitud que el observado para el control positivo; aquí sólo se observa la presencia de una pequeña roncha, que no evoluciona a una lesión mayor (Figuras 7 y 8).

Así la DT 50% para la solución de *Trichoderma sp*, podría mostrarse como un intervalo de dosis, debido a que se observan dos partes de esta curva, en la primera conforme la dosis aumenta el efecto también aumenta; hasta llegar a un efecto máximo, después de este punto aunque aumente la dosis administrada, el efecto disminuye e incluso no se presenta (Figuras 9 y 10),

originando así curvas de efecto bifasico, motivo por el cual el intervalo de dosis en el que se presentará efecto es 1035 mg/Kg a 1429 mg/Kg (Gráficos 6 y 7), en base a esto la DT 50% que tomaremos será de 1035 mg/Kg.

Cuadro 11. Resultados para DL 50% aguda, vía dérmica para Trichoderma sp.

C (-)	0.5 mL/kg	-	0/3	0/3	0/3	0	0	0	0	3.62	3.62	3.62
C (+)	1000	3	3/3,	3/3,	0/3	100	100	0	0	6.38	6.38	3.62
Tr	600	2.78	3/3,	0/3	0/3	100	0	0	0	6.38	3.62	3.62
Tr	1200	3.08	3/3,	2/3,	0/3	100	66.67	0	0	6.38	5.43	3.62
Tr	2400	3.38	3/3,	0/3	0/3	100	0	0	0	6.38	3.62	3.62
Tr	9000	3.95	3/3,	0/3	0/3	100	0	0	0	6.38	3.62	3.62

Los cálculos de UP se realizaron de igual forma que en el Cuadro 9.

Gráfico 6. Relación porcentaje - dosis para DL 50% aguda, vía dérmica para Trichoderma sp.

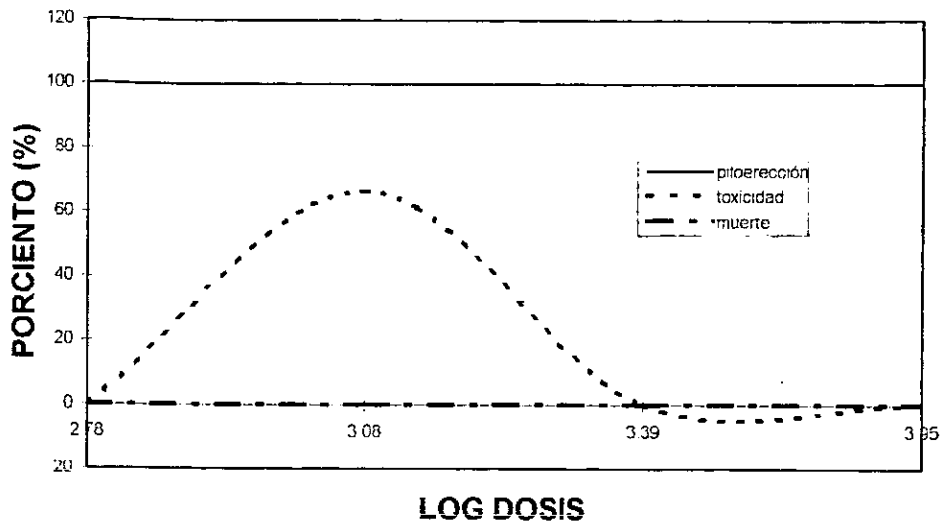


Gráfico 7. Relación Unidades de probabilidad - dosis para DL 50% aguda, vía dérmica para Trichoderma sp.

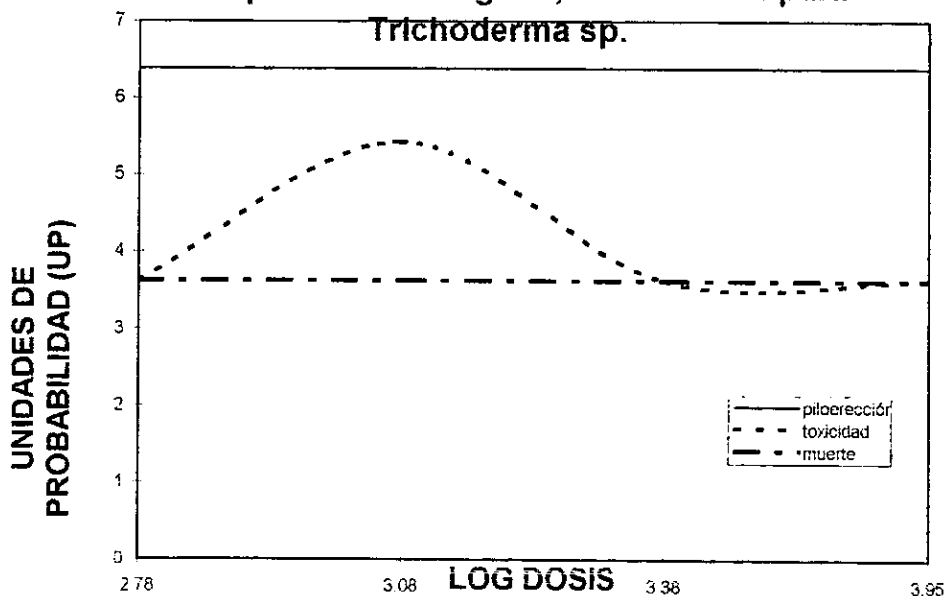




Figura 5. Efecto causado por el control positivo sobre *Rattus norvegicus*, exposición aguda vía dérmica (1000 ppm)

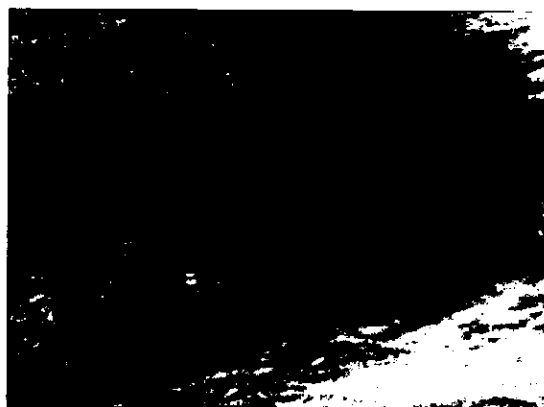


Figura 6. Efecto causado por el control positivo sobre *Rattus norvegicus*, exposición aguda vía dérmica (1000 ppm)

Figura 7. Efecto causado por *Trichoderma sp* sobre *Rattus norvergicus*, exposición aguda (1200 ppm) vía dérmica.

Figura 8. Efecto causado por *Trichoderma sp* sobre *Rattus norvergicus*, exposición aguda (1200 ppm) vía dérmica.

Figura 9. Efecto causado por *Trichoderma sp* sobre *Rattus norvergicus*, exposición aguda (9000 ppm) vía dérmica, no se observa lesión.

Figura 10. Efecto causado por *Trichoderma sp* sobre *Rattus norvergicus*, exposición aguda (9000 ppm) vía dérmica, no se observa lesión.

VI. DL 50% , subcrónica

6.1 Estimación de dosis letal media subcrónica, vía oral.

Este método trata del estudio a plazo semilargo (90 días) para determinar los efectos de una sustancia sobre especies mamíferas como la rata siguiendo una exposición repetida y prolongada. Bajo las condiciones de prueba de toxicidad los efectos que requieren un período de latencia largo o las manifestaciones por acumulación pueden presentarse, también pueden presentarse los efectos adversos como resultado de la exposición diaria a dieta, agua y sustancia de prueba controlada de especies mamíferas por periodo de 90 días.

Este método debe generar datos para identificar a la mayoría de los efectos subcrónicos y debe de ser útil para definir la relación dosis-respuesta en un largo periodo (1 año). En adición la prueba debe permitir la detección de efectos tóxicos generales y proveer información de daño en órganos y posible acumulación y puede ser usado para establecer criterios de seguridad de exposición en humanos, así como proveer información del potencial de seguridad para una exposición repetida por largos periodos de tiempo.

Por el contrario si la dosis letal no es determinada y la dosis administrada en la dieta es mayor a 1000 mg/ Kg entonces las dosis por debajo de este valor son consideradas como no tóxicas (ASTM, 1999)⁷.

6.1.1 Objetivo

Estimación de la dosis letal media, subcrónica vía oral en ratas.

Estimación de dosis tóxica media subcrónica vía oral en ratas.

Observación de las alteraciones y /o efectos que se presenten en los roedores en un lapso de 90 días.

6.1.2 Hipótesis

· Si la estimación de DL50% presentada por la solución humectable de *Trichoderma sp*, es mayor a 5000 mg/kg, entonces representará un nivel de riesgo precautorio (categoría IV), de acuerdo al cuadro de criterios de toxicidad para pesticidas (cuadro 1).

6.1.3. Material

Jeringas de 5 mL, marca plastipak
Balanza grantaria, marca OHAUS
Marcadores de colores, marca Esterbrook
Reloj con cronómetro

Ratas albinas, cepa Wistar, adultos jovenes machos peso 280 g –340g
Solución de *Trichoderma sp*, marca LITHAN
Agua destilada o purificada, distribuidor Guesson-Velarde
Glicerina grado USP, marca Fabrica de jabón LA CORONA S.A.
Sulfato de cobre pentahidratado, marca SULFACOB 25

composición %	% peso
CuSO4 *5H2O	mayor igual a 98.23
Impurezas	menor igual a .77
total	100.00 g

6.1.4. Desarrollo experimental.

1. Tomar cada rata y etiquetarla

2. Mantener los animales en periodo de aclimatación durante 5 días.
3. Pesarse diariamente a cada individuo durante la semana de aclimatación, anotar la cantidad de alimento de ingesta por día (entre 15-20g), el agua debe ser administrada ad libitum.
4. Verificar que cada rata se encuentre "saludable"
5. Establecer al azar grupos de 3 animales para realizar 3 niveles de dosis que se establecerán de acuerdo a la DL50% aguda oral (> 9000 mg/kg).

Cuadro 12. Niveles de dosis para DL 50% subcrónica, vía oral

Baja	0.25X	2250 mg/ kg
Media	0.5X	4500 mg/kg
Alta	1X	9000 mg/kg
Control (-)	solvente	0.1 mL/ 100 g
Control (+)	CuSO ₄ *5H ₂ O	2500 mg/kg

6. La administración de la sustancia de prueba será incorporado al alimento mediante la siguiente ecuación:

$$X = 100 K / G \quad \text{donde:}$$

X = % de la sustancia prueba en la dieta expresada en g sustancia /100 g alimento por día.

K= dosis de la sustancia que se desea en g sustancia / kg de peso por día.

G = consumo medio alimenticio por día en una semana expresado en g de comida/ kg peso por día.

(ASTM, 1999)⁸.

7. Pasada la semana de aclimatación administrar la dosis asignada a cada grupo, incorporada en el alimento y administrar agua ad libitum.
8. De ahí en adelante preparar las mezclas de acuerdo a los pesos corporales medios y consumo registrados en la 1ª semana .

9. Registrar estas observaciones al menos una vez al día, incluir signos de toxicidad (por grupo de dosis), incluir grado, tiempo y duración, los cambios pueden ser en la piel, ojos, membranas mucosas, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pelaje, actividad somatomotor y convulsiones.

10. Administrar la sustancia activa 5 días a la semana, por un período de exposición de al menos 12 semanas.

11. Pesar a los animales al menos una vez a la semana o el mismo día cada semana y registrar los pesos.

Si la variación de peso registrada es significativa, se debe cambiar la dieta del individuo.

12. Al cabo del período de exposición sacrificar a los "sobrevivientes", realizar necropsia, incluir examinación externa de la superficie del cuerpo, orificios y sus contenidos.

6.1.5 Peso y cálculos

Solución de <i>Trichoderma sp.</i>	3.43x10 ⁹ esp/ mL	531.65 mg/mL
Solución de <i>Trichoderma sp.</i>	4.45x10 ⁹ esp/ mL	689.7 mg/mL
Solución de CuSO ₄ *5H ₂ O	320 mg/mL	

Cuadro 13. Relación peso-volumen por administrar para DL 50% subcrónica, vía oral, para 1^a sem.

Tratamiento	Rata	Peso (g)	mL admon/100 g	
	R 1	237	1 mL /kg	1.3
	R 2	265	1 mL /kg	1.5
	R 3	281	1 mL /kg	1.6
	Rata	Peso (g)	Dosis (mg/kg)	mL admon/100 g
	V 1	267	2500	11.9
	V 2	288	2500	12.9
	V3	227	2500	11.9

	A 1	279	2250	6.7
	A 3	288	2250	6.9
	A 4	285	2250	6.9
media	C 1	233	4500	11.1
media	C 2	266	4500	13.0
media	C 3	227	4500	11.3
media	N 2	265	9000	25.6
media	N 3	278	9000	26.9
media	N 4	254	9000	24.5

Cálculos:

Dosis por administrar 2250 mg/Kg; 2.25 g/kg

Peso rata , por ejemplo 279g; 0.279kg

Peso promedio de alimento ingerido 17.5 g

Solución de esporas a concentración de 531 mg/mL; 0.531 g/ mL

Utilizando la ecuación del punto número 6 tenemos:

$$X = (100 * 2.25 \text{ g/kg}) / (17.5 \text{ g} / 0.279 \text{ kg})$$

$$= 225/62.72 = 3.58 \text{g esporas} / 100 \text{ g de alimento}$$

$$0.531 \text{ g} \text{ ---} 1\text{mL}$$

$$3.58 \text{ g} \text{ ---} X = 6.74 \text{ mL de solución} / 100 \text{ g de alimento}$$

Los cálculos de las siguientes semanas se realizaron de manera semejante, tomando en cuenta el peso reportado en esa semana. Cuando la solución de *Trichoderma* a la concentración 531.65 mg/mL se terminó se utilizó la solución de 689.7 mg/mL.

6.1.6 Resultados y discusión

De los datos contenidos en el cuadro 14, se observa que el grupo de animales del control negativo no presenta efectos tóxicos, mucho menos letalidad, confirmándose que dicha sustancia no presenta toxicidad intrínseca y no potencia efectos tóxicos que puedan presentarse con la sustancia de prueba.

En el grupo de animales del control positivo si se observan efectos tóxicos y mortalidad de 33.33%, baja en comparación con lo observado en el ensayo agudo por vía oral (sección 5.2), aún cuando se utilizó la misma dosis, pero recordemos que en este ensayo la aplicación se realizó incorporando la sustancia al alimento consumido en todo el día y con acceso de agua ad libitum, más no con sonda como en el ensayo agudo, a pesar de esto último la mortalidad se presentó, confirmando su toxicidad en un solo animal.

Respecto a la sustancia de prueba (solución de esporas *Trichoderma sp.*) encontramos, que sólo en el grupo de dosis baja se presenta la muerte 33.33%, mientras que la toxicidad se presenta en el grupo de dosis 2250 y 4500 ppm, entre tanto para la dosis 9000 no se observa efecto alguno en este ensayo de aplicación subcrónica, contrastando con el ensayo de aplicación aguda (sección 5.2) en el cual se presentaron efectos tóxicos para la dosis 9000ppm, diferencia ocasionada puesto que la aplicación también se realizó mediante la incorporación de la sustancia en el alimento de todo el día y acceso al agua ad libitum, efecto semejante mencionado para el control positivo, lo anterior se confirma al observar los gráficos 8 y 9, donde la curva bifásica de efecto se encuentra recorrida hacia la derecha del eje, ahora bien la curva de letalidad en ningún momento ha cruzado por el límite de control de 50% o en su defecto por 5 unidades de probabilidad, confirmando no se puede estimar la DL50% al igual que en la sección 5.2, para este ensayo tampoco es posible determinar la DT 50% puesto que la curva representativa tampoco cruza por la línea media,

de la DE50% no hacemos ninguna observación puesto que para la sustancia prueba debido a su uso se determina en plantas.

6.1.6.1 Resultados patológicos

· Los resultados se encuentran en las hojas foliadas de acuerdo al siguiente orden;

Folio BOI-690 corresponde al grupo de tratamiento *Trichoderma sp*, dosis baja .

Folio BOI-691 corresponde al grupo de tratamiento *Trichoderma sp*, dosis media.

Folio BOI-692 corresponde al grupo de tratamiento *Trichoderma sp*, dosis alta .

Folio BOI-693 corresponde al grupo de tratamiento control negativo.

Folio BOI-694 corresponde al grupo de tratamiento control positivo.

Cuadro 14. Resultados para DL50% subcrónica, vía oral para Trichoderma sp.

Tratamiento	1mL/kg dosis	LOG	RELACIÓN		PORCENTAJE(%)		UP	
			efecto toxicidad	muerte	efecto toxicidad	muerte	efecto toxicidad	muerte
C(-)	-	-	0/3, 0/3,	0/3, 0/3,	0 0	0 0	3.62 3.62	3.62 3.62
C(+)	2500 ppm	3.40	0/3, 1/3,	muerte 1/3,	0 33.33	muerte 33.33	3.62 3.62	3.62 4.57
Tr baja	2250 ppm	3.35	0/3, 1/3,	1/3, 1/3,	0 33.33	33.33 33.33	3.62 3.62	4.57 3.62
Tr media	4500 ppm	3.65	1/3, 0/3,	0/3, 0/3,	33.3 0	0 0	4.57 3.62	3.62 3.62
Tr alta	9000ppm	3.95	0/3, 0/3,	0/3, 0/3,	0 0	0 0	3.62 3.62	3.62 3.62

Los cálculos de UP se realizaron de igual forma que en el cuadro 9.

Gráfico 8. Relación porcentaje - dosis para DL50% subcrónica, vía oral para Trichoderma sp.

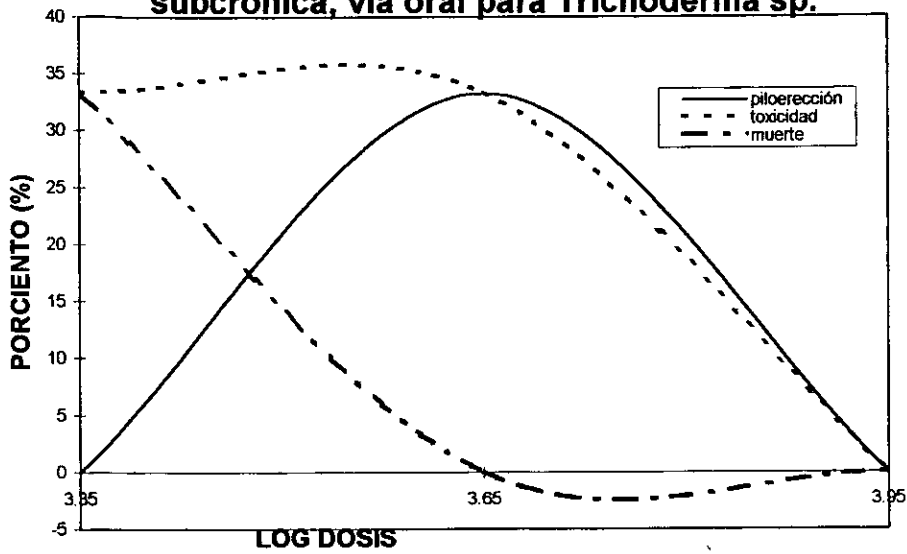
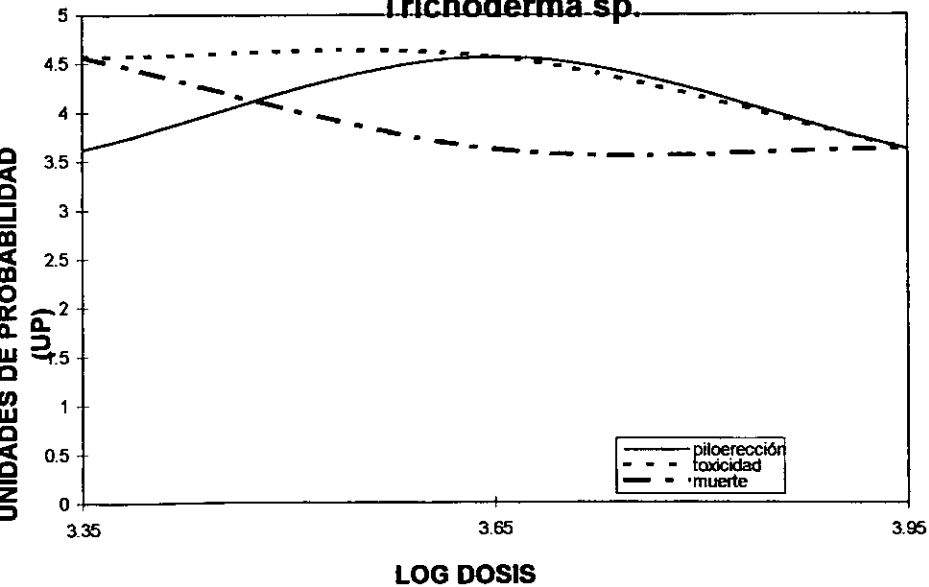


Gráfico 9. Relación unidades de probabilidad - dosis para DL50% subcrónica, vía oral para Trichoderma sp.





Departamento de Patología

Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

RESULTADO No. B01-690

Expediente clínico:

Especie: **Roedor**

Raza: **Wistar**

Sexo: **Macho**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.

Estómago: La mucosa presenta pequeños agregados de linfocitos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares, así como congestión moderada difusa.

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.
2. Gastritis linfocítica discreta zonal
3. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal
4. Proliferación ligera de conductos biliares- Hígado

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio

ATENTAMENTE

MVZ. Felix Sanchez Godoy

Vb. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Apartado Postal 21-085 C.P. 04510, Coyoacán . Tel/Fax. 622-58-88 y 616-10-60
México, D.F.



Departamento de Patología

Resultado de estudio histopatológico

RESULTADO No. B01-691

Especie: Roedor

Sexo: Macho

Expediente clínico:

Raza: Wistar

Edad: Adulto

Remitente: Facultad de Química

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares, así como congestión moderada multifocal,

Riñón: Presenta congestión moderada difusa

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

- 1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.**
- 2. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal**
- 3. Proliferación ligera de conductos biliares- Hígado**

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio.

ATENTAMENTE

MVZ.  Félix Sánchez Godoy

Vo. Bo.


Dr. Gilberto Chávez Gris

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Apartado Postal 21-085 C.P. 04510, Coyoacán . Tel/Fax. 622-58-88 y 616-10-60

México, D.F.

59





Departamento de Patología

Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

RESULTADO No. B01-692

Expediente clínico:

Especie: **Roedor**

Raza:

Sexo:

Edad:

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa

Estómago: La submucosa presenta pequeños agregados de eosinófilos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta congestión moderada difusa.

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.
2. Gastritis eosinofílica ligera multifocal
3. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio

ATENTAMENTE

MVZ. Félix Sánchez Godoy

Vo. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris





Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

RESULTADO No. B01-693

Expediente clínico:

Especie: **Roedor**

Raza: **Wistar**

Sexo: **Macho**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa, así como pequeños agregados de linfocitos alrededor de vasos sanguíneos.

Estómago: La submucosa y la muscular presenta pequeños agregados de eosinófilos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares, así como congestión moderada multifocal,

Riñón: Presenta pequeños agregados de células inflamatorias compuestas por linfocitos en la pelvis renal, así como congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. **Dermatitis perivascular linfocitaria ligera multifocal con hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.**
2. **Gastritis eosinofílica ligera multifocal**
3. **Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal**
4. **Proliferación ligera de conductos biliares- Hígado**
5. **Pielonefritis linfocitaria ligera zonal**

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio

ATENTAMENTE

MVZ. Felix Sánchez Godoy

Vo. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris





Departamento de Patología

Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

RESULTADO No. B01-694

Especie: **Roedor**

Sexo: **Macho**

Expediente clínico:

Raza: **Wistar**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.

Estómago: La submucosa presenta pequeños agregados de eosinófilos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares, así como congestión moderada multifocal.

Riñón: Presenta pequeños agregados de células inflamatorias compuestas por linfocitos en el intersticio renal, así como un material granular intensamente basofílico en túbulos renales (nefrocalcinosis).

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.
2. Gastritis eosinofílica ligera multifocal
3. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal
6. Proliferación ligera de conductos biliares- Hígado
7. Nefritis linfocitaria ligera multifocal con focos de nefrocalcinosis

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio.

ATENTAMENTE

MVZ. Felix Sánchez Godoy

Vo. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris



6.2 Estimación de la dosis letal media subcrónica, vía dérmica.

Este método describe un procedimiento experimental para la asignación y evaluación de características tóxicas, de aplicación diaria en la piel de animales experimentales durante 90 días, al contrario, no es aplicable para determinar efectos que tiene un periodo de latencia largo (por ejemplo; carcinogenicidad) o corto.

Este método también, provee información sobre riesgos de salud e información necesaria para establecer criterios de seguridad para exposición humana, pero sin dejar de lado la detección de signos de toxicidad y otros diferentes de letalidad, información sobre órganos blanco y posibles efectos acumulativos, que pueden ser un parámetro de referencia de selección de dosis para estudios crónicos (ASTM,1999)⁶.

6.2.1 Objetivo

Estimación de la DL 50% y DT 50% subcrónica, vía dérmica en ratas.

Observación de las alteraciones y/o efectos que presenten los animales en un lapso de 90 días.

6.2.2 Hipótesis.

Si la estimación de DL50% presentada por la solución humectable de *Trichoderma sp*, es mayor a 1200 mg/kg, entonces representará un nivel de riesgo moderado (categoría II), de acuerdo al cuadro de criterios de toxicidad para pesticidas (cuadro 1).

6.2.3 Material.

Balanza grantaria, marca OHAUS

Marcadores de colores, marca Esterbrook

Aspersor

Reloj con cronómetro

Isopos de algodón o gasa absorbente

Rasuradora, marca Trimer ES-505

Tijeras para estilista, marca Barrilito

Ratas albinas, cepa Wistar, adultos jóvenes machos

Solución de *Trichoderma sp*, marca LITHAN

Agua destilada o purificada, distribuidor Guesson-Velarde

Glicerina grado USP, marca Fabrica de jabón LA CORONA S.A.

Sulfato de cobre pentahidratado, marca SULFACOB 25

composición %	% peso
CuSO ₄ *5H ₂ O	mayor igual a 98.23
Impurezas	menor igual a .77
total	100.00 g

6.2.4 Desarrollo experimental

1. Tomar cada una de las ratas y etiquetarla.
2. Mantener a los animales en aclimatación durante 5 días
3. Pesar diariamente a cada individuo durante la semana de adaptación, anotar la cantidad de alimento de ingesta por día (entre 15-20g), el agua debe ser administrada ad libitum
4. Establecer al azar grupos de 3 animales para realizar 3 niveles de dosis que se darán de acuerdo a DT 50% aguda dérmica (1200 mg/kg)

Cuadro 15. Niveles de dosis para DL 50% subcrónica, vía dérmica

baja	0.25X	300 mg/ kg
media	0.5X	600 mg/kg
alta	1X	1200 mg/kg
control (-)	solvente	0.5 mL/ 100 g
control (+)	CuSO *5H O	1000 mg/ kg

5. Cortar el pelo del área dorsal del tronco aproximadamente antes de la prueba o afeitar si es necesario.

Cortar el pelo del animal semanalmente, tener cuidado pues puede afectar la permeabilidad de la piel.

6. Pasada la semana de adaptación administrar la dosis asignada a cada grupo, por aspersión y con la ayuda de una gasa porosa si es necesario, proporcionar agua y alimento ad libitum.

7. De ahí en adelante preparar las mezclas de acuerdo a los pesos corporales medios.

8. Registrar las observaciones al menos una vez al día, incluir signos de toxicidad (por grupo de dosis), incluir grado, tiempo y duración, pueden ser cambios en la piel, ojos, membranas y mucosas, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pelaje, actividad somatomotora y convulsiones.

9. Administrar la sustancia activa 5 días a la semana, por un periodo de exposición de al menos 12 semanas.

10. Si existe acumulación de la sustancia de prueba se puede limpiar el dorso del animal con un lienzo húmedo con agua para remover la sustancia de prueba, secar el dorso con un paño suave.

11. Pesar a los animales al menos una vez a la semana o el mismo día cada semana y registrar los pesos.

Si la variación de peso registrada es significativa, se debe cambiar la dieta del individuo.

12. Al cabo del periodo de exposición sacrificar a los "sobrevivientes", realizar necropsia, incluir examinación externa de la superficie del cuerpo, orificios y sus contenidos.

6.2.5 Peso y cálculos

Solución de <i>Trichoderma sp.</i>	4.22 x10 ⁸ esp/ mL	65.41 mg/mL
Solución de <i>Trichoderma sp.</i>	3.43 x10 ⁹ esp/ mL	531.65 mg/mL
Solución de <i>Trichoderma sp.</i>	4.45 x10 ⁹ esp/ mL	689.7 mg/mL
Solución de CuSO ₄ *5H ₂ O	320 mg/mL	

Cuadro 16. Relación peso- volumen por administrar para DL 50% subcrónica, vía dérmica, 1^a semana.

Tratamiento	Rata	Peso (g)		mL admon
C 5	R 5	344	0.5 mL /100g	1.72
C 6	V 1	328	0.5 mL /100g	1.6
C 8	V 3	355	0.5 mL /100g	1.7
Tratamiento	Rata	Peso (g)	Dosis	mL admon
C 10	V 4	394	1000	1.2
C 11	V 5	380	1000	1.2
C 12	C 1	377	1000	1.2
C 13	N 1	411	300	1.8
C 14	N 2	339	300	1.5
C 15	N 3	353	300	1.6
C 16	N 4	360	600	3.3
C 17	N 5	356	600	3.2
C 18	R 1	341	600	3.1
C 19	R 2	363	1200	0.8

R 3	393	1200	0.8
R 4	351	1200	0.7

Cálculos

Dosis 300 mg/kg

Peso rata por ejemplo 434g

Solución de *Trichoderma* utilizada 65.41 mg/mL

300 mg — 1000 g

$$X^1 \text{ ——— } 434 \text{ g} \qquad X^1 = 130.2 \text{ mg}$$

65.41 mg — 1 mL

$$130.2 \text{ mg — } X^2 \qquad X^2 = 1.9 \text{ mL por administrar diario}$$

Los cálculos para las siguientes semanas se realizaron de manera semejante. Cuando la solución de *Trichoderma* a la concentración 531.65 mg/mL se terminó se utilizó la solución de 689.7 mg/mL, tomando en cuenta el peso promedio utilizado en esa semana.

6.2.6 Resultados y discusión

Los resultados asentados en el cuadro 17, confirman que la sustancia control negativo no presenta efectos tóxicos intrínsecos o potencia los que presenta la sustancia problema, al igual que en los tres ensayos anteriores (secciones 5.2, 5.3, 6.1).

Del grupo de tratamiento con el control positivo se observan efectos tóxicos semejantes a los de la sección 5.3, al ser la misma dosis aplicada y puesto que no se presenta un efecto mayor o diferente sugiere que estos son efectos agudos debido a la administración diaria, esto se observa en las figuras 11, 12 y 13. La presencia de los efectos dérmicos se da alrededor del cuarto día de aplicación, para la irritación e inflamación esta se presentó alrededor del

quinto día, y la lesión alrededor del sexto día presenta tendencia semejante al ensayo agudo (sección 5.3), es importante mencionar que tan solo uno de los animales experimentales hasta el día de término presentaba lesiones, sin embargo en los otros animales dejaron de presentar lesiones alrededor de 5 días antes del término, se puede pensar en "tolerancia" a la sustancia.

Estos datos sugieren al igual que para el control positivo, con la solución de *Trichoderma sp.*, el efecto y la letalidad tienen tendencias semejantes que en la sección 5.3, siendo el efecto mínimo presentado la piloerección, mientras que la DL50% y DT50% no es posible calcularlas puesto que las curvas representativas no cruzan la línea media, sin embargo con una DT por debajo de 30% si sería posible calcularla aunque no es significativa toxicológicamente hablando, este efecto es posible observarlo en las figuras 14,15 y 16, y al igual que en la sección 5.3 el efecto tóxico observado no es de igual magnitud que para el control positivo pues no evoluciona a una lesión mayor.

6.2.6.1 Resultados patológicos

Los resultados se encuentran en las hojas foliadas de acuerdo al siguiente orden;

Folio BOI-695 corresponde al grupo de tratamiento control positivo.

Folio BOI-696 corresponde al grupo de tratamiento control negativo.

Folio BOI-697 corresponde al grupo de tratamiento *Trichoderma sp.*, dosis baja.

Folio BOI-698 corresponde al grupo de tratamiento *Trichoderma sp.*, dosis media.

Folio BOI-699 corresponde al grupo de tratamiento *Trichoderma sp.*, dosis alta.

Cuadro 17. Resultados para DL50% subcrónica, vía dérmica apra Trichoderma sp.

ppm	RELACION		PORCENTAJE		UP					
	efecto	muestra	efecto	muestra	efecto	muestra				
C(-)	5 mL/kg	0/3,	0/3,	0	0	0	3.62	3.62		
	Dosis	LOG	efecto	oxidación	muestra	efecto	oxidación	muestra		
C(+)	1000	3	2/3,	3/3,	0/3,	66.67	100	0	5.43	6.38
Tr baja	300	2.48	1/3,	0/3,	0/3,	33.33	0	0	4.57	3.62
Tr media	600	2.78	1/3,	1/3,	0/3,	33.33	33.33	0	4.57	4.57
Tr alta	1200	3.08	1/3,	0/3,	0/3,	33.33	0	0	4.57	3.62

Los cálculos de UP se realizaron de igual forma que en el Cuadro 9.

Gráfico 10. Relación porcentaje - dosis para DL50% subcrónica, vía dérmica para Trichoderma sp.

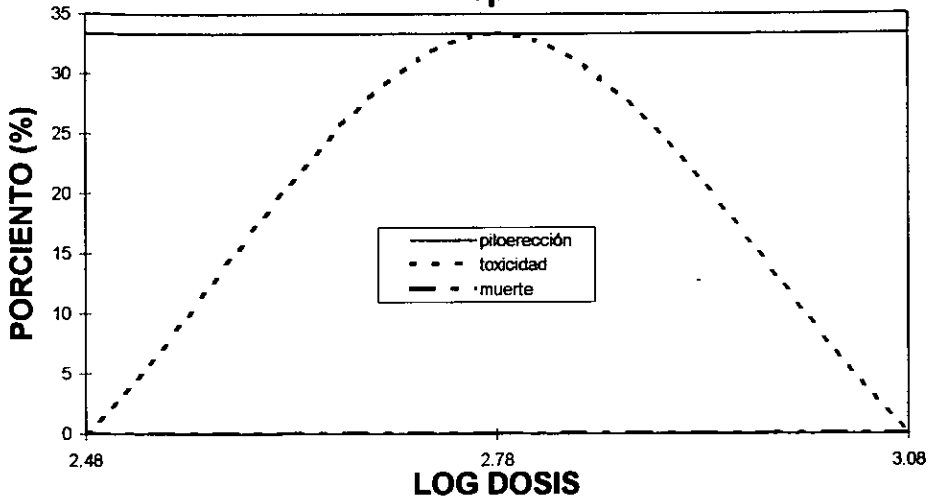


Gráfico 11. Relación unidades de probabilidad - dosis para DL50% subcrónica, vía dérmica para Trichoderma sp.

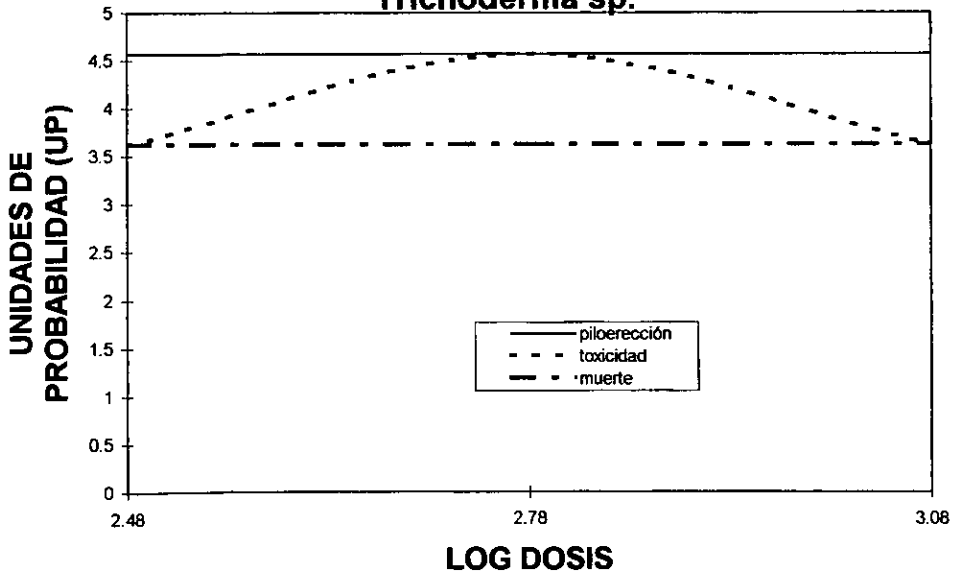




Figura 11. Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre *Rattus norvegicus*, exposición subcrónica (30 días), vía dérmica.

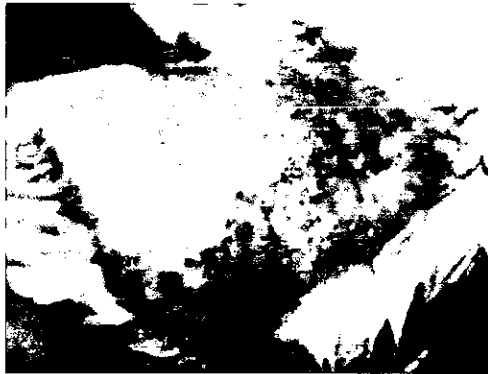


Figura 12. Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre *Rattus norvegicus*, exposición subcrónica (60 días), vía dérmica.

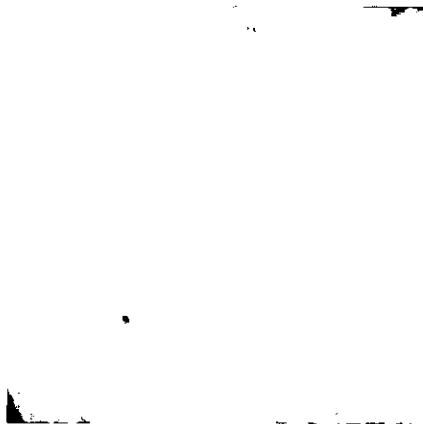


Figura 13. Efecto causado por el control positivo (1000 ppm) sobre *Rattus norvegicus*, exposición subcrónica (90 días), vía dérmica.



Figura 14. Efecto causado por *Trichoderma sp* (1200 ppm) sobre *Rattus norvergicus*, exposición subcrónica (30 días), vía dérmica.



Figura 15. Efecto causado por *Trichoderma sp* (1200 ppm) sobre *Rattus norvergicus*, exposición subcrónica (60 días), vía dérmica.



Figura 16. Efecto causado por *Trichoderma sp* (1200 ppm) sobre *Rattus norvergicus*, exposición subcrónica (90 días), vía dérmica.



Departamento de Patología

Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

Expediente clínico:
Raza: **Wistar**
Edad: **Adulto**
Remitente: **Facultad de Química**
Propietario:

RESULTADO No. B01-695

Especie: **Roedor**

Sexo: **Macho**

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.

Estómago: La submucosa y la muscular presenta pequeños agregados de eosinófilos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares que en algunas ocasiones presentan escasos linfocitos alrededor de ellos, así como congestión moderada multifocal,

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.
2. Gastritis eosinofílica ligera multifocal
3. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal
4. Proliferación ligera de conductos biliares- Hígado

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio.

ATENTAMENTE

MVZ. Félix Sánchez Godoy

Vo. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Apartado Postal 21-085 C.P. 04510. Coyoacán. Tel/Fax. 622-58-88 y 616-10-60

México, D.F.



Departamento de Patología

Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

Expediente clínico:

Raza: **Wistar**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

RESULTADO No. B01-696

Especie: **Roedor**

Sexo: **Macho**

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta congestión moderada multifocal.

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

Estómago: Sin cambios patológicos significativos

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. **Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.**
2. **Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal**

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio

ATENTAMENTE

MVZ.  Felix Sanchez Godoy

Vo. Bo.


Dr. Gilberto Chávez Gris





Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

RESULTADO No. B01-697

Expediente clínico:

Especie: **Roedor**

Raza: **Wistar**

Sexo: **Macho**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa,

Estómago: Sin cambios patológicos significativos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta congestión moderada multifocal,

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. **Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.**
2. **Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal**

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio.

ATENTAMENTE

MVZ. *Felix Sanchez Godoy*

Vo. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Apartado Postal 21-085 C.P. 04510, Coyoacán . Tel/Fax. 622-58-88 y 616-10-60

México, D.F.



Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

Expediente clínico:

Raza: **Wistar**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

RESULTADO No. B01-698

Especie: **Roedor**

Sexo: **Macho**

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.

Estómago: Sin cambios patológicos significativos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares así como congestión moderada multifocal,

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.
2. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal
3. Proliferación ligera de conductos biliares- Hígado

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio.

ATENTAMENTE

MVZ. Felix Sánchez Godoy

Vo. Bo.

Dr. Gilberto Chávez Gris





Resultado de estudio histopatológico

11 de Septiembre del 2001.

RESULTADO No. B01-699

Expediente clínico:

Especie: **Roedor**

Raza: **Wistar**

Sexo: **Macho**

Edad: **Adulto**

Remitente: **Facultad de Química**

Propietario:

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:

Se recibe varias porciones de tejido que corresponden a hígado, estómago, intestino delgado, riñón y piel.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Piel: Presenta hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa

Estómago: La submucosa y la muscular presenta pequeños agregados de eosinófilos.

Intestino delgado: En algunas secciones las vellosidades se observan comprimidas y con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.

Hígado: Presenta proliferación moderada de conductos biliares que en algunas ocasiones presentan escasos eosinófilos alrededor de ellos, así como congestión moderada multifocal.

Riñón: Presenta congestión moderada difusa.

DIAGNOSTICOS MORFOLOGICOS:

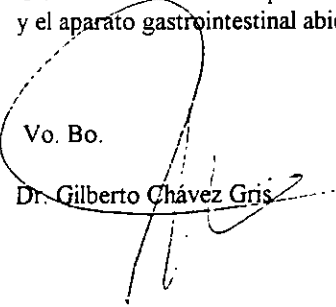
1. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa.
2. Gastritis eosinofílica ligera multifocal
3. Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica moderada multifocal
4. Hepatitis eosinofílica discreta zonal con proliferación ligera de conductos biliares

COMENTARIO: Para próximas ocasiones se recomienda remitir los órganos fijados en formol al 10% y el aparato gastrointestinal abierto y sin contenido alimenticio

ATENTAMENTE

MVZ.  Félix Sánchez Godoy

Vo. Bo.

 Dr. Gilberto Chávez Gris



Cuadro 18. Tabla de resultados generales para *Trichoderma sp.*

Artemia Salina	1096 mg/kg	-	10000	Los datos no son fidedignos, a partir de 2500 ppm no se puede observar la muerte sobrevivencia de los crustáceos por falta de luz sección 4.5	III
Aguada	Oral	-	8960	La curva representativa de letalidad no cruza por el limite de control al 50%, por lo que no puede calcularse DL-50%. Sección 5.2.6	IV
	Dérmica	>8960 mg/kg	1000 mg/Kg	DL50% no puede calcularse situación semejante al ensayo anterior. DT50% es un rango de dosis por que la curva representativa es bifásica. Sección 5.3.6	III
Subartrófica	Oral	-	9000	Tanto la curva de letalidad como de toxicidad no cruzan por el limite de control al 50%, por lo que no es posible calcular DL50% y DT50%. Sección 6.1.6	IV
	Dérmica	>9000 mg/kg	1035 -1429 mg/Kg	Las curvas de letalidad y toxicidad se comportan de manera semejante al ensayo anterior Sección 6.2.6	II
			9000		
			1200		

(*) El ensayo no es confiable.

(**) Referencia al cuadro 1, de la sección 2.5

(-) No calculado.

Caudro 19. Resumen de resultados patológicos para ensayos subcrónicos.

Resultados patológicos para ensayo subcrónico, vía oral.

Dx morfológico/grupo tratamiento	C (-)	C (+)	baja 2250 ppm	media 4500 ppm	alta 9000 ppm
Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa	X	X	X	X	X
Gastritis linfocítica discreta zonal	X	X	X		X
Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica multifocal	X	X	X	X	X
Proliferación de conductos biliares - hígado	X	X	X	X	
Pielonefritis linfocitaria ligera zonal	X				
Dermatitis perivascular	X				
Nefritis linfocitaria multifocal		X			

Resultados patológicos para ensayo subcrónico, vía dérmica.

Dx morfológico/grupo tratamiento	C (-)	C (+)	baja 300 ppm	media 600 ppm	alta 1200 ppm
Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada difusa	X	X	X	X	X
Gastritis eosinofílica ligera multifocal		X			X
Enteritis linfoplasmocitaria y eosinofílica multifocal	X	X	X	X	X
Proliferación de conductos biliares - hígado		X		X	
Hepatitis eosinofílica discreta zonal					X

VII. RESULTADOS GENERALES Y CONCLUSIONES

7.1 Resultados

Los resultados generales concentrados en el cuadro 18, muestran las DT50% calculadas y las DL50% estimadas de los diferentes ensayos realizados.

Se ha dicho que DE50% es la dosis a la que la sustancia de prueba produce un efecto en el 50% de la población (para nuestro caso no corresponde a su efectividad sobre agentes patógenos en plantas). Cuando este efecto es tóxico (muerte para nuestro caso), DL50% se torna el parámetro más importante para los toxicólogos. Algunos compuestos tienen otra curva intermedia que se conoce como curva de efectos tóxicos (DT); esta describe los efectos que no son deseables ni letales (Rivero, 2001)³². Tomando en cuenta lo anterior y en vista que las curvas de letalidad no cruzaban la línea horizontal al 50%, se optó por el cálculo de DT en los ensayos que fue posible, sin embargo, tomando en cuenta la dosis máxima probada o aplicada en cada ensayo y observando que no producía efectos tóxicos se puede decir que la letalidad se encuentra por encima de esta última dosis, estos resultados concuerdan con los resultados patológicos que se realizaron (Cuadro 19, y secciones 6.1.6.1 y 6.2.6.1), debido principalmente a que lo reportado se enuncia como difuso, ligero o moderado , puesto que al ser realizado por una tercera como estudio ciego (FVZ, UNAM.) y no tener el parámetro exacto de porcentaje o cantidad de tejido afectado puede omitirse, respaldado también debido a que no se observaron daños a simple vista (macroscópicos), con tan solo una excepción, correspondiente a tejido de piel del control negativo , para el ensayo DL50% subcrónica dérmica.

Haciendo un breve recordatorio, la gastritis es una inflamación de la mucosa gástrica, puede ser superficial por lo que no es peligrosa, esto se pudo presentar por el método de sacrificio, este se realizó mediante cámara

de eter, recordemos que esta sustancia es irritante y lesiona mucosas por lo que es probable la patología presentada se debiera a su uso. Ahora bien la enteritis que se presenta es moderada, recordemos que esta definida como infección del intestino causado por virus, bacterias y hongos, estado normal al ingerir la gran cantidad de microorganismos, para arrastrar a los agentes hacia el ano y expulsarlos.

En lo que se refiere a la hiperqueratosis, se puede relacionar por el constante corte de pelo en el animal, por el continuo frote con tijeras y rasuradora, estado esperado por la metodología aplicada.

Pasando a la nefritis presentada por el control positivo subcrónica, vía oral, es de esperarse recordemos que la sustancia aplicada es sulfato de cobre pentahidratado, siendo este un metal causa lesión renal, concordando con el sujeto en tratamiento.

La pielonefritis es una lesión del intersticio renal causada por infección bacteriana, sin embargo el sujeto que lo presento correspondía a control negativo por lo que el contacto con el hongo no pudo ser el causante de esta patología, al igual que la dermatitis presentada por este mismo sujeto. Para la hepatitis discreta zonal, presentada por un sujeto del grupo de tratamiento 1200 ppm, subcrónica vía dérmica, no es congruente puesto que esta patología se define como infección viral de los hepatocitos. La última patología que queda por mencionar es la proliferación de conductos biliares – hígado, recordando que la bilis es secretada en los hepatocitos, hacia los canículos biliares localizados entre las células hepáticas, donde se vacían hacia los conductos biliares terminales y de allí a los conductos biliares más anchos, hasta alcanzar el conducto hepático y el colédoco, del cual la bilis va directamente hacia el duodeno o se desvía para entrar al vesícula biliar, la bilis es requerida para la digestión de grasas principalmente, y debido que la glicerina (sustancia control negativo) es obtenida como un subproducto en la producción de ácidos grasos, este pueda contener gran cantidad de ellos y por lo tanto requerir su digestión, por lo que la proliferación de conductos biliares- hígado se presentó

sin embargo no representa un signo de toxicidad, además no es ocasionado por el principio activo esporas de *Trichoderma sp.*

7.2 Conclusiones

* Sobre la base de la información presentada y analizada, el cuadro de resultados generales (cuadro 18) señala la información toxicológica de la solución humectable de esporas de *Trichoderma sp* en una especie roedora, para su registro como fungicida biológico.

*Dentro del contexto de este mismo cuadro y del criterio de toxicidad para plaguicidas, la solución humectable de esporas de *Trichoderma sp*, se encuentra clasificada en la categoría IV para pruebas orales y dentro de la categoría III para pruebas dérmicas, lo que sugiere un riesgo precautorio y toxicidad media para la población.

* Es innegable que toda sustancia puede producir un efecto o la presencia de una patología, en mayor o menor grado en un organismo (como ya lo había mencionado *Paracelso*), para fortuna nuestra la solución humectable de *Trichoderma sp.* evaluada parece no iniciar alguna patología grave, sin embargo esto no debe ser tomado en terminos absolutos puesto que aún no se descarta en su totalidad de las patologías presentadas, aún cuando se trato de establecer la posible causa.

* Ante la presencia de cualquier efecto o patología es necesario pensar que los factores ambientales tienen gran influencia por lo que no hay que despreciarlos, además de las variaciones entre individuos, pues no todos los organismos responden de la misma manera a los estímulos y el grado en que todo esto afecte, por lo anterior un efecto no se le puede adjudicar a una sola causa en su totalidad.

* Aún con los datos obtenidos es necesario el uso de medidas precautorias y de seguridad, como equipo de trabajo adecuado para el manejo de plaguicidas.

*Es importante el conocimiento de la peligrosidad de cualquier sustancia, cualquiera que sea su uso, en especial si se tiene conocimiento del contacto con la población (campesinos, jornaleros y sus familias para el caso de los plaguicidas), nosotros como profesionales de la química tenemos la gran encomienda del discernimiento de las sustancias como benéficas o peligrosas, teniendo en cuenta el costo - beneficio en materia de salud.

* Una investigación toxicológica de este tipo implica trabajo arduo, pero sobre todo recursos, sin embargo, es recomendable el seguimiento de esta investigación para la **determinación** de DT50%. El inicio de este tipo de investigaciones para muchas de las sustancias que se encuentran en uso en la industria, reduciría notablemente los riesgos en salud en un país como México.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Altman J. (ed) **Pesticide interactions in crop production. Benefical and Deleterious effect.** USA. CRC press.,1993 Págs 400-404.
- ² Abdel-Barry J. A., Mohammad H.H., Al-Hakiem **Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of *Trigonella foenum-graecum* in mice.** J. Ethnopharmacol 2000;(70):65-68.
- ³ ASTM Designation E-555-95 "Determining Acute Oral LD50 for testing Vertebrate control agents Standard practice for" **Biological effects and enviromental Fate Biotechnology: pesticides.** Vol 11.05. section 11. 1999 Págs 112-113
- ⁴ ASTM Designation E-609-81 "Standar Terminology relating to pesticides" **Biological effects and enviromental Fate Biotechnology: pesticides.** Vol 11.05. section 11. 1999 Págs 140.
- ⁵ ASTM Designation E-758-98 "Mammalian Acute Percutaneous Toxicity Standard test Method for" **Biological effects and enviromental Fate Biotechnology: pesticides.** Vol 11.05. section 11. 1999 Págs 249-253._
- ⁶ ASTM Designation E-1103-96 "Determining Subchronic Dermal Toxicity Standard Test Method for" **Biological effects and enviromental Fate Biotechnology: pesticides.** Vol 11.05. setion 11. 1999 Págs 410-413.
- ⁷ ASTM Designation E-1163-87 "Estimating Acute Oral Toxicity in Rats tandard Test Method for" **Biological effects and enviromental Fate Biotechnology: pesticides.** Vol 11.05. section 11. 1999 Págs 699-702.

⁸ ASTM Designation E-1619-95 "Chronic Oral Toxicity Study in Rats Standard Test Method for" **Biological effects and environmental Fate Biotechnology: pesticides**. Vol 11.05. section 11. 1999 Págs 1039-1042.

⁹ Baker H.J, J. R. Lindsey (eds). Historical foundations. In: **The laboratory rat. Biologs and diseases**. Vol I, USA: American College of laboratory Animal Medical, 1979 Págs 2-11, 86,156-157.

¹⁰ Bhushan M.N. **Handbook of natural pesticides: Methods, teory, practice and detection**. Vol 1. Boca Ratón, Florida. CRC Press.. 1990 Págs 273-295.

¹¹ Catálogo oficial de plaguicidas Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. México. CICLOPLAFEST. 1995 Págs 67-447.

¹² Coble H.D, A.R. Bonanio, B. McGaughey, et al. **Feasibility of prescription use in the Unites States**. 1998 CAST. http://www.cast-science.org/press_ip.html

¹³ **Commercial bicontrol products for use against soilborne crop diseases**. (2000). <Http://www.barc.usda.bov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html>

¹⁴ Dean J. ALange. **Manual de Química**. Tomo II. 13ª edición. México. Editorial Mac Graw Hill.. 1989. Págs 4-11, 4-48.

¹⁵ De Paz Hernández L. **Evaluación *In vitro* del potencial biocontrolador de tres especies del género *Trichoderma***. México Tesis de licenciatura en Ingeniería Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM,. 1998 Págs 20-30.

- ¹⁶ **Epidemiología** Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica. 2000;17, semana 50 Pág. 16.
- ¹⁷ Estrada M.N., P.E. Velez-Arango, J. C. López **Estandarización de una metodología para obtener cultivos monoesporicos del hongo *Beauveria bassiana*** . Cenicafé 1997;48 (1): 59-65.
- ¹⁸ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.. 6ª edición. México D.F. Secretaria de Salud. 1994.Págs 1575-1604.
- ¹⁹ Feron V.J., P.J. Van Bladeren, R.J.J. Hermus **A Viwepoint on the extrapolation of toxicological data from animals to man**. Chem Toxic 1990 ; 28:783-788.
- ²⁰ Gómez A. E., E.B. Naranjo **Manual para el uso y manejo de animales de laboratorio, rata y ratón**. 2ª edición. México. Facultad de química. UNAM. 1999. Págs 12,18 ss.
- ²¹ Goodman, A. & Gilman. **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. 9ª edición. Vol 1 . México. Editorial Mac Graw Hill Interamericana .. 2000 Págs 1-9, 52-53, 69-71 ss.
- ²² Hodosh R. J., E.M. Keough, Y. Luthra **Toxicology evaluation and registration requeriments for biorational pesticides. Handbook of natural pesticides: Methods, teory, practice and detection**. Vol 1.. Boca Ratón, Florida. CRC Press 1990 Págs 231-272.
- ²³ Hernández Luis F. **Material de apoyo para Toxicología**. Meéxico. Facultad de Química.UNAM. 1998 Págs 1.1-1.5, 6.4-6.10.

- ²⁴ Katzung, B. **Farmacología Básica y Clínica**. 5ª edición. México. Editorial El Manual Moderno. 1994 Págs 36-39.
- ²⁵ Keith L.H., M.M. Walkey **Handbook of air toxics: Sampling, analysis and properties**. CRC Press Inc. 1995 Págs 207-209.
- ²⁶ Kim L. (ed) **Advanced Engineered Pesticides**. USA. Marcel Dekker Inc. 1993 Págs 270, 321-333.
- ²⁷ Litchfield J.T. jr, F Wilcoxon. **A simplified method of evaluating dose-effects experiments**. J Pharmacol. Exptl. Therap., 96:99-(1949)
- ²⁸ Lorke D. **A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing**. Arch Toxicol. 1983;54: 275-287.
- ²⁹ Martínez Castillo M. A. **Manual de cuidados y utilización de animales de laboratorio: ratas, ratones y conejos**. Tesis de licenciatura. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1984. Pág 6.
- ³⁰ Melby E.C.Jr., M. Baker (eds) **The importance of laboratory animal genetics health and the environment in biomedical**. USA: Academic Press Inc. 1983. Págs 25-33.
- ³¹ MERK INDEX (Budaviri (ed).20ª edición. USA. The merck index and Co. Inc 1996 Págs 508, 447, 763-764.
- ³² Rivero O., P. Rizo, G. Ponciano, G. Oláiz. **Daños a la salud por Plaguicidas**. Mexico. Editorial El Manual Moderno. 2001 Págs 1-7, 31-41,53-59, 99-105, 204-225, 264, 352-356.

³³ Robinson R. Taxonomy and Genetics. In: **The laboratory rat. Biologs and diseases.** Vol I, USA: American College of laboratory Animal Medical, 1979 Págs 38-44.

³⁴ Roman F.D. **Innovación y Desarrollo Farmacéutico.** México. Asociación Farmacéutica Mexicana. 1990 Págs 41-50.

³⁵ Rosiello A.P., J. M. Essigmann, G.N. Wogan. **Rapid and Accurate Determination of the median Lethal dose (LD 50) and its error with a small computer.** Journal of Toxicology and Environmental Health. 1977 Págs 797-809.

³⁶ Soriano Rosales R. **E Manual aalas para entrenamiento de técnicas en animales de laboratorio:** Tesis de licenciatura en Médico Veterinario Zootecnista. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1997 Págs 110-112, 323-324, 345-346, 547-550, 591-595.

³⁷ Teng Wah S. Toxicity testing using the Brine Shimp: *Artemia Salina*. **Bioactive Natural products: detection, isolation and estructural determiantion.** Colgate S.M., R.J. Molyheaux eds. CRC Press Inc. (1993) Págs 441-457.

³⁸ Yee E, S.J. Amour, R.W. Bide. **A Three Dimensional, Probit Based, Non-Linear Dose-Response Model for Calculation of the Mortality-Concentration-Tiem Response Surface.** Validity of animals Models of Human Respiratory Diseases: Annual Symposium Lovelace Respiratory Reseach Institute: 2001.

³⁹ drperez.com

⁴⁰ sngc.munic/biology/env1000/ichaulk

IX. GLOSARIO

AGENTE. Lo que tiene poder para producir un efecto.

ANTAGONISTA. Guarda una relación estructural con el tóxico y compite con éste por el sitio activo del receptor donde actúa, modificando así la respuesta de las células efectoras.

ANTÍDOTO. Es un compuesto químico capaz de combinarse con el tóxico y originar una nueva molécula, en general inerte, polar y fácil de eliminar.

ASPERSIÓN. Asperjar, rociar

AMPOLLA. Vejiga formada por la elevación de la epidermis.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Sociedad americana para pruebas y materiales. Agencia que se encarga de evaluar los procedimientos de pruebas y experimentos.

BIOACTIVACIÓN. Biotransformación del xenobiótico durante la cual se forman metabolitos más tóxicos que el compuesto madre.

BIOTRANSFORMACIÓN. Proceso en el que intervienen diversas enzimas y cofactores localizados en órganos específicos, para convertir compuestos lipófilos en metabolitos hidrófilos.

CEPA. Tronco u origen de una familia. Línea de individuos que comparten las mismas características, conjunto de características genotípicas y fenotípicas que se obtienen y conservan después de veinte cruces consanguíneas.

CICLOPLAFEST. Comisión Intersecretarial para el control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y sustancias tóxicas. Es un órgano de coordinación entre diferentes secretarías (SECOFI, SAGAR, SEMARNAP Y SSA) que responde a la política nacional de simplificación administrativa con el objetivo de realizar actividades coordinadas de regulación y control, así como de agilizar la expedición de registros y autorizaciones de importación respecto a plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas.

CONVULSIONES. Contracción muscular espasmódica, violenta y repetida.

DOSIS. Cantidad de sustancia aplicada por unidad tratada o aplicada en un organismo.

DOSIS DE REFERENCIA. (RfD) Consumo máximo diario recomendado para un compuesto determinado.

DOSIS DIARIA PROMEDIO DE POR VIDA. (LADD) Se obtiene mediante la concentración del toxicógeno en el medio por la frecuencia de contacto por la fracción de contacto por la duración de la exposición todo esto entre el peso corporal por el tiempo de vida.

DOSIS EFECTIVA MEDIA (DE50%) Dosis de la sustancia que produce un efecto en la mitad de la población.

ed. Abreviatura de editor

EFICIENCIA. Depende de la potencia (CE50), eficacia máxima, capacidad para llegar a los receptores pertinentes, puede depender de la vía de administración, absorción, distribución en el organismo.

EPA. Environmental Protection agency. Agencia que se encarga de regular y aprobar las sustancias utilizadas como pesticidas, así como de dar las directrices de pruebas para la seguridad de los usuarios.

ESCORIACIONES. Escoriar, excoriar, gastar o arrancar la piel de una parte del cuerpo.

ERADICACIÓN. Completa eliminación de una plaga en cierta área.

EXPOSICIÓN. Medida de la cantidad de sustancia que ha ingresado al organismo.

FUMIGANTE. Sustancia química en forma gaseosa utilizada para matar o inhibir una plaga.

INCUBAR . Encobar, empollar, producir crías.

INDICE TEREPÉUTICO. (TI) Proporción de la dosis requerida para producir un efecto tóxico, y la dosis, con frecuencia mediana, necesaria para obtener una respuesta terapéutica deseable. $TI = DL50 / DE 50$. Es una relación de la medición relaciona la dosis que se requiere para producir un efecto deseado de la que produce un efecto no deseado, señalando el grado de selectividad.

INFLAMACIÓN. Proceso de reacciones en un tejido al contacto con agentes patógenos, se caracteriza por enrojecimiento, calor, tumefacción y dolor.

PPM. Abreviatura de unidades partes por millón, tiene equivalencias tales como mg/ Kg, mL/ Kg, $\mu\text{g}/\text{g}$, $\mu\text{g}/\text{mL}$.

PLAGA. Organismo existente que bajo ciertas circunstancias puede causar desastres.

PLAGUICIDA. Conjunto de compuestos químicos concebidas y fabricados para exterminar insectos y otros organismos que causan enfermedades en el hombre o reducen el volumen y la calidad de las cosechas agrícolas.

PELIGRO. Capacidad de las sustancias de causar efectos dañinos, es una medida de la toxicidad inherente que plantea la sustancia, en caso de no carcinógenos se expresa como dosis de referencia (RfD) y como factor de unidad de riesgo (q1*) para los carcinógenos.

PERIODO DE ACLIMATACIÓN O ADAPTACIÓN. Tiempo necesario para un animal de ajuste en el laboratorio.

POTENCIA. Se refiere a la concentración (CE 50%) o dosis (DE 50%) de un fármaco que se requiere para producir el 50% del efecto máximo de esa sustancia, depende en gran parte de la afinidad de los receptores para enlazarse con la sustancia y en parte a la eficiencia con la cual la interacción sustancia - receptor se acopla a la respuesta. La potencia de una sustancia se expresa en unidades de dosificación por lo general en términos de un objetivo terapéutico específico (vgr. 50 mg para sedación leve).

POTENCIA RELATIVA. Es la relación de las dosis que producen un mismo efecto, puede servir en la comparación de una sustancia con otra.

RIESGO. Posibilidad de la población al entrar en contacto (exponerse) con las sustancias peligrosas de que alguna produzca esos efectos en una situación determinada.

RIP. Abreviación de muerto.

RONCHA. Bultillo que se eleva en el cuerpo del animal, ampolla.

SUSTANCIA. Cada una de las distintas clases de materia que se distinguen entre sí por un conjunto de propiedades.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN. Tiempo durante el cual un organismo esta en contacto con una sustancia, esta influenciado por la duración y frecuencia.

TOLERANCIA. Es un fenómeno caracterizado por la necesidad de aumentar la cantidad de sustancia para obtener el mismo efecto. La tendencia de las sustancias para inducir tolerancia es muy variable, los ejemplos mas claros son los alcaloides del opio. Si bien es un fenómeno muy estudiado, e l mecanismo por el que se produce es aún desconocido.

TOXICIDAD. Poder de una sustancia de causar daño, es una propiedad intrínseca de la misma y depende de varios factores como dosis y exposición.

TOXICIDAD DÉRMICA. Efecto tóxico en un organismo resultado del contacto con un pesticida sobre la piel.

TOXICOGÉNOS. Sustancias químicas utilizadas en el comercio, que incluyen aditivos para alimentos, fármacos terapéuticos y químicos industriales.

TOXICOLOGÍA . Ciencia que se ocupa de los efectos adversos que ejercen las sustancias químicas en los órganos vivos.

TOXINAS. Sustancias químicas que producen las especies animales, en particular insectos, reptiles y microorganismos.

UP. Probability units, unidades probit, unidad de probabilidad. Unidad que señala la desviación con respecto a la mediana, cada unidad probit es igual a una desviación estandar, por lo que la unidad probit 4 es igual a 16 % y la unidad probit 6 es igual a 86%.

ÚRENTE. Que sucede, ardiente.

XENOBIÓTICO. Toda sustancia extraña al ser viviente, incluye sustancias benignas o dañinas.

ANEXO

Anexo 1. MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

* Temperatura de mantenimiento: 26.3°C promedio

* Ciclo luz - oscuridad: 12 hrs promedio

* Marca comercial : Nutri - cubos

* Distribuidor: Ralston Rations

* Importado por: Purina S.A. de C.V.

Reg SARH A -0207-246

* Leyendas: Para animales de laboratorio

Recomendada para la alimentación de roedores pequeños de laboratorio como ratas, ratones y hamsters. Su fórmula contiene el balance óptimo de aminoácidos, vitaminas y minerales, así como otros nutrientes esenciales para cubrir las necesidades de los roedores en cualquier etapa de su vida, no está diseñado para maximizar la producción en colonias de reproductores.

Nutricubos ofrece una dieta expertamente balanceada para un excelente desempeño de los roedores en los experimentos a largo plazo, minimizando los efectos de las variables nutricionales.

Su forma se adecua mejor al comedero evitando desperdicios y aumentando el rendimiento del alimento. Su empaque evita la contaminación del producto y hace más fácil su manejo.

* Instrucciones de uso: adminístrese a libre acceso a roedores, se debe tener agua limpia y fresca disponible todo el tiempo. RATAS adultas comerán 12 y 15 gramos por día. RATONES adultos comerán de 4 a 5 gramos por día, aunque estirpes grandes pueden llegar a comer hasta 8 gramos por día. HAMTERS adultos comerán entre 10 y 14 gramos por día.

* Composición: Humedad máx. 12.0%

Proteína	min.	23.0%
Grasa	min.	3.0%
Fibra	máx.	6.0%
Cenizas	máx.	7.0%
E.L.N. (por DIF)		49.0%
Calcio	máx.	1.0%
Fósforo	min.	0.6%

* Presentación: Bulto 20 kg

* Advertencia: Consérvese en un lugar fresco y seco. No lo sirva si cambia de apariencia o se enlana.

Anexo 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Medio salino. Pesar 37.75 gr de medio salino Instan ocean por cada litro de agua.

- Solución agua - glicerina 1:1 peso/ peso. Pesar un gramo de glicerina por cada gramo de agua pesada.

-Sulfato de cobre.

Solución 200 mg/ mL. Pesar 5 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, llevarlo a un matraz de 25 mL, aforarlo con agua.

Solución 320 mg /mL. Pesar 8.14 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, llevarlo a un matraz de 25 mL, aforarlo con agua.

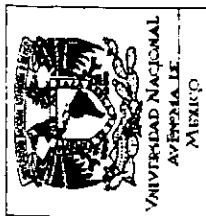
DL 50% AGUDA

VIA _____

TRATAMIENTO _____

DOSIS _____

RATA _____



FECHA	HR/DIA	estado general	movimientos generales	ingesta agua	ingesta alimento	heces	respiración	pelos	movimientos gastrointestinales	iritación ocular	vigilia dormida
	1.1										
	2.1										
	3.1										
	4.1										
	5.1										
	6.1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
	11										
	12										
	13										
	14										

