

*Acta*  
*Toxicológica*  
*Argentina*

Publicación Oficial de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Volumen 12  
Número 1  
Julio 2004

Acta Toxicológica Argentina es el órgano de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Tiene por objetivo básico la publicación de trabajos originales, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, temas de divulgación, comentarios bibliográficos, notas técnicas y cartas al editor. Asimismo, se publicarán noticias relacionadas con los diferentes campos de la Toxicología. Asimismo, se publicarán noticias relacionadas con los diferentes campos de la Toxicología.



ASOCIACIÓN  
TOXICOLÓGICA  
ARGENTINA

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)  
Adherida a la IUTOX

*Acta  
Toxicológica  
Argentina*

## Asociación Toxicológica Argentina

### Comisión Directiva

#### Presidente

Osvaldo H. Curci

#### Vicepresidente

Lucrecia Ferrari

#### Secretaria

Sandra Demichelis

#### Tesorera

Susana I. Garcia

#### Vocales

Marta A. Carballo  
Teresa M. Fonovich  
Hector R. Girolami

#### Vocales Suplentes

Eduardo Brocca  
Adriana A. Perez

### Organo de Ficalización

#### Titulares

Otmaro Roses  
María Luisa Oneto

#### Suplente

Raúl A. Alzogaray

#### Comité Científico

Gerardo Castro  
Juan Carlos Piola  
Otmaro Roses  
Edda Villaamil  
Eduardo Zerba

#### Tribunal de Honor

Mauricio Plager  
María del Carmen Villarruel  
Alfredo Salibián

### Acta Toxicológica Argentina

#### Director

Osvaldo H. Curci *Poder Judicial de la Nación*

#### Comité de Redacción

Raúl A. Alzogaray *CIPEIN (CITEFA-CONICET)*  
Gerardo D. Castro *CEITOX (CITEFA-CONICET)*  
Sandra O. Demichelis *FCEN-UNLP*  
Héctor R. Girolami *FBIOyF-UNR*  
Edda C. Villaamil *FFyB-UBA*

#### Comité Editorial 2004

José A. Castro *CEITOX-CITEFA / CONICET - Argentina*  
Antonio Colombi *Universidad de Milán - Italia*  
Franz Delbeke *Universidad de Gante - Belgica*  
Heraldo Donnewald *Poder Judicial de la Nación - Argentina*  
Ricardo Duffard *CONICET - Univ. Nac. de Rosario - Argentina*  
Ana S. Fulginiti *Universidad de Córdoba - Argentina*  
Nilda G. G. de Fernícola *CETESB - Brasil*  
Veniero E. Gambaro *Universidad de Milán - Italia*  
Carlos A. García *Instituto de Estudios Bioquímicos - Argentina*  
Estela Gimenez *ANMAT - Argentina*  
Hector Godoy *INTA / CIC - Pcia. de Bs. As. - Argentina*  
Carlos Reale *Univ. Nacional del Sur - Argentina*  
Felix G. Reyes *Universidad de Campinas - Brasil*  
Irma Rosas Pérez *Univ. Autónoma de México - México*  
Alfredo Salibián *CIC - Univ. Nac. de Lujan - Pcia. de Bs. As. - Argentina*  
Marta Salseduc *Lab. Bagó. Univ. Austral - Argentina*  
Edward Smith *IPCS - Suiza*  
Roberto Tapia Zuñiga *Chile*  
Enrique Tourón *Argentina*  
Norma Vallejo *Universidad de Bs. As. - Argentina*  
Eduardo Zerba *CIPEIN - CITEFA / CONICET - Argentina*

**INDICE**  
**(CONTENTS)**

EDITORIAL .....	1
SCREENING GENOTÓXICO DE HIERBAS MEDICINALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL ARGENTINA <i>GENOTOXIC SCREENING OF MEDICINAL HERBS USED IN ARGENTINEAN FOLK MEDICINE</i> Gadano Andrea, Gurni Alberto y. Carballo Marta Ana .....	2
CUANTIFICACIÓN DE BRODIFACOUM, BROMADIOLONE Y DIFENACOUM EN SUERO HUMANO POR HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA Y FLUOROMÉTRICA <i>QUANTIFICATION OF BRODIFACOUM, BROMADIOLONE AND DIFENACOUM IN HUMAN SERUM BY HPLC WITH ULTRAVIOLET AND FLUOROMETRIC DETECTION</i> Olmos Valentina, Lenzken Silvia Carolina, del Carmen Paz Myriam, Olivera Nancy Mónica, Domínguez Sergio, López Clara Magdalena y Otmario Enrique Roses.....	9
ADOLESCENTES CON CUADROS NEUROLÓGICOS E HIPERAMONIEMIA, ASOCIADO AL ANTECEDENTE DE INGESTIÓN DE JUGOS DE FRUTA SEMI-SINTÉTICOS <i>ADOLESCENTS WITH HYPERAMMONEMIA AND NEUROLOGICAL SYMPTOMS, ASSOCIATED TO INGESTION OF SYNTHETIC FRUIT JUICES</i> Piola Juan Carlos, Ezpeleta Daniel Carlos, Prada Dora Beatriz, Evangelista Marcela.....	15
CAPTACION DE CADMIO POR BIOMASA LIBRE O INMOVILIZADA DE <i>Nostoc minutum</i> (CIANOBACTERIA FILAMENTOSA) <i>CADMIUM BIOSORPTION BY FREE AND IMMOBILIZED NOSTOC MINUTUM</i> Ferrari Susana G., Guzmán Gabriela C., Silva Patricia G., Alcaráz Lucía E., Silva Humberto J. y González Diana M. ....	19
INDICES - INDEXES / VOLUMEN 11 - VOLUME 11 (2003).....	23
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES <i>INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS</i> .....	23

Los resúmenes de los artículos publicados en Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en la base de datos LILACS, en la dirección literatura científica del sitio [www.bireme.br](http://www.bireme.br)  
Acta Toxicológica Argentina está indexada en el Chemical Abstracts. La abreviatura establecida por dicha publicación para esta revista es *Acta Toxicol. Argent.*  
Calificada como Publicación Científica Nivel 1 por el Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT), en el marco del Proyecto Latindex

## **EDITORIAL**

### **Toxicología y reproducción**

La reproducción humana comprende un área que incluye un número amplio de disciplinas, como la endocrinología, la biología celular, la fisiología, anatomía, biología del desarrollo, la bioquímica y la biología molecular. Debido a que el proceso reproductivo es crítico para la perpetuación de cualquier especie de organismo, los factores o agentes que alteran o interrumpen este proceso pueden producir consecuencias devastadoras.

Hoy sabemos que tales agentes pueden provenir de muy distintas fuentes, que pueden ser farmacológicas, ambientales y naturales, y además implican una diversidad estructural química inmensa. Además, los efectos pueden producirse a través de la acción individual o en combinación y pueden suponer un mecanismo único o múltiples etapas en un tejido o sistema. Como tal, es difícil imputar de una sola acción o efecto a una determinada sustancia. Debido a esto es que la toxicología experimental provee la base racional para determinar la extensión, magnitud y severidad de una exposición a determinados compuestos bajo estudio.

Más importante es, y esto se deriva de muchos estudios toxicológicos recientes, que hay un creciente número de ejemplos que muestran que la exposición a tóxicos en determinadas etapas del desarrollo resultan en efectos a largo plazo que se expresan en la madurez sexual y la adultez. Ciertos sistemas u órganos son más susceptibles a los tóxicos durante estos períodos de desarrollo. Es muy importante reconocer que no solo los adultos sino entonces también los niños e incluso el feto en desarrollo son blancos potenciales de la agresión tóxica. La exposición durante estos períodos "sensibles" altera el desarrollo normal, resultando en efectos inmediatos o agudos como también subsecuentemente compromete la fisiología normal y la función en la vida que sigue.

Algunos procesos biológicos son comunes a ambos sexos, sin embargo otros son exclusivos de uno de ellos y esto requiere de una comprensión aun más profunda de los procesos tóxico-reproductivos, si se quiere evaluar las acciones específicas. La reproducción es un proceso fisiológico complejo que involucra a varios sistemas de órganos como el neuroendocrino, el tracto reproductivo, los órganos sexuales accesorios y las gónadas. Todos estos sistemas actúan de manera coordinada para asegurar la fertilidad en ambos sexos. La infertilidad o el compromiso de la función reproductiva puede ocurrir en un órgano determinado, como en las gónadas, o en un número amplio de puntos dentro de sistemas de órganos, tales como los centros neuroendocrinos, que en última instancia afectan la reproducción por un mecanismo alternativo. Por último, es preocupante encontrar efectos tóxico-reproductivos para una variedad de sustancias a las cuales el ser humano está expuesto de modo masivo por vías como la dieta, la ocupación o los hábitos. El campo de acción de esta apasionante rama de la Toxicología debe comprender incluso a aquellas sustancias químicas con actividad hormonal o antihormonal. El conocimiento generado dentro de las disciplinas que estudian la reproducción aportará a las soluciones que la Toxicología de la reproducción plantea para muchos de los grandes problemas toxicológicos que hoy enfrenta la humanidad y muestra con claridad su naturaleza multidisciplinaria.

G.D.C.

## SCREENING GENOTÓXICO DE HIERBAS MEDICINALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL ARGENTINA

(\*) Andrea Gadano<sup>1</sup>; Alberto Gurni<sup>2</sup>. y. Marta Ana Carballo<sup>1</sup>.

- 1 - CIGETOX - Citogenética Humana y Genética Toxicológica, Departamento de Bioquímica Clínica.
- 2 - Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Andrea B. Gadano. Facultad de Farmacia y Bioquímica - CIGETOX - Depto. Bioquímica Clínica  
Junín 956 (1113) - Buenos Aires. - Argentina  
Tel: (5411) 5950-8707 (trabajo). Fax: (5411)-5950-8694. e-mail: abgadano@yahoo.com.ar

**RESUMEN.** Gadano, A.; Gurni, A. y Carballo, M. A. **Screening genotóxico de hierbas medicinales utilizadas en la medicina tradicional argentina.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1): 2-8* En los últimos años se ha vuelto a las plantas en busca de nuevos principios activos, ya que desde el comienzo de la medicina fueron ellas las que proveyeron las estructuras bases para numerosos medicamentos. Entre los principios activos de origen vegetal más utilizados en terapéutica se pueden citar *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L. Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) O.K. (Asteraceae); *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae). En el presente trabajo se propone estudiar a los mismos a nivel genotóxico mediante el ensayo de *screening*. Electroforesis de una sola Célula. En la electroforesis de una sola célula (ensayo del cometa) se analiza directamente el material genético de las células de interés. De esta manera, en primera instancia, resulta ser una metodología rápida y sencilla para la detección de posibles mutágenos evidenciados por la inducción de roturas en la doble hélice del ADN. En el *screening* genotóxico realizado sobre seis especies diferentes de plantas medicinales Argentinas mediante la electroforesis de una sola célula, se determinó que cuatro de ellas indujeron daño al ADN. Las plantas que indujeron roturas doble y simple cadena fueron: *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua); *Solanum sysimbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (molle de beber).

**ABSTRACT.** Gadano, A.; Gurni, A. and Carballo, M. A. **Genotoxic screening of medicinal herbs used in argentinean folk medicine.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1): 2-8* Herbal medicines have become a popular form of therapy. Patients who are self-medicated with herbs for preventive and therapeutic purposes may assume that these products are safe because they are "natural", but some of their products can cause adverse effects or have the potential to interact with other drugs. Some common herbs of the Argentinean traditional medicine are: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L. Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) O.K. (Asteraceae); *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae). The single cell gel electrophoresis detects DNA strands breaks, alkali labile sites and incomplete excision repair events in individual cells; is a rapid and sensitive method for the detection of DNA damage induced *in vitro* or after environmental and occupational exposures. The aim of the present work is to evaluate the potential genotoxic effects of the aqueous extracts of the mentioned medicinal herbs by the Single Cell Gel Electrophoresis as a *screening* test. Our results shows that four of the six plants evaluated induced double strand and simple strand breaks in the DNA. The ones that interact with the genetic material were: *Chenopodium multifidum* ("paico"); *Schkuhria pinnata* ("canchalagua"), *Solanum sysimbriifolium* ("espino colorado") and *Lithraea molleoides* ("molle de beber").

**Palabras clave:** medicina alternativa; plantas medicinales; genotoxicidad, ensayo del cometa.  
**Key words:** traditional medicine; medicinal herbs; genotoxicity; comet assay.

### INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha retornado el interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas estructuras bioactivas, ya que desde el comienzo de la medicina fueron ellas las que proveyeron las estructuras bases para numerosos medicamentos. Cabe recordar que la salicina y el ácido salicílico, aislados de la corteza del sauce (género *Salix*), fueron los precursores no sólo de la aspirina sino también del ibuprofeno.

Del total de las prescripciones (recetas médicas) confeccionadas en el primer mundo, alrededor del 25% de las mismas corresponde a principios activos contenidos en plantas superiores y este porcentaje se ha mantenido constante en los últimos 10 años. Generalmente la actividad farmacológica de las hierbas medicinales se asocia con la toxicidad de las mismas y el efecto tóxico inducido depende de la dosis consumida. Por esto resulta atractivo estudiar las plantas tóxicas como fuente de productos bioactivos.

Entre las plantas medicinales argentinas de reconocida actividad farmacológica, podemos citar las siguientes: *Chenopodium multifidum* L.; *Lithraea molleoides*; *Styphnolobium japonicum*; *Schkuhria pinnata*; *Prosopis alba*; *Solanum sysimbriifolium* (Tabla 1).

Los compuestos químicos presentes en las plantas medicinales pueden interactuar directa o indirectamente con el ADN, produciendo cambios que afectan el funcionamiento celular y que a largo plazo causan trastornos en la salud. De ahí la importancia de detectar en sus etapas iniciales, la acción sobre el material genético.

En estudios de genotoxicidad, las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales.

Uno de los ensayos útiles para la detección de daño de simple y de doble cadena al ADN es la Electroforesis de una Sola Célula (Ensayo del Cometa), donde se evalúan los niveles de daño y reparación.

(\*) Autor a quien dirigir la correspondencia

Nombre Botánico	Nombre Vulgar	Usos Etnofarmacológicos
<i>Chenopodium multifidum</i> L. (Chenopodiaceae).	Paico	Antihelmíntico, laxante, abortivo.
<i>Lithraea molleoides</i> Vell. Engl. (Anacardiaceae)	Molle de beber	Diurético, antiartrítico, tónico, hemostático.
<i>Styphnolobium japonicum</i> L. Schott. (Fabaceae)	Sofora	Antimicrobiano (uso externo).
<i>Prosopis alba</i> Gris. (Mimosaceae)	Algarrobo blanco	Trastornos oculares, alimentarios (semillas).
<i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) O.K. (Asteraceae)	Canchalagua	Agente lipolítico.
<i>Solanum sysimbriifolium</i> Lam. (Solanaceae)	Espino colorado	Abortivo.

**Tabla 1.** Usos etnofarmacológicos de plantas medicinales de consumo habitual en la República Argentina.

ción al ADN en poblaciones celulares, sin la necesidad de trabajar con células en proliferación. Es un sistema potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido.

Una gran ventaja de este método es la posibilidad de obtener información del daño inducido en células aisladas. La mayoría de los métodos usados comúnmente para detectar el daño al material genético son capaces de dar una respuesta promedio. En poblaciones celulares heterogéneas, los valores promedios no son de utilidad para describir el efecto de una sustancia determinada. Esto es especialmente cierto en casos donde se encuentra diferente susceptibilidad en la respuesta a una droga.<sup>1</sup>

El fundamento de la técnica consiste en lisar las células de interés, embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. Posteriormente, el ADN liberado será sometido a la acción de un campo eléctrico a pH neutro.<sup>2</sup> En las células en las que exista incremento del daño al ADN se formarán pequeños fragmentos. Estos, al ser sometidos a una corriente eléctrica, tendrán la propiedad de penetrar en la malla de agarosa migrando, de esta manera, hacia el ánodo.

La capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo dependerá del tamaño de los fragmentos generados por la lesión. Por medio de la coloración con bromuro de etidio (colorante con afinidad por el ADN), darán la imagen de pequeños cometas. El largo del cometa se incrementa con el daño inducido a la doble hélice del ADN.

Teniendo en cuenta lo antedicho y sobre la base de los datos referidos en la literatura en lo que a toxicidad de las plantas medicinales se refiere, el objetivo del presente trabajo es estudiar el potencial efecto genotóxico de diferentes especies de

Plantas Medicinales de consumo masivo en la República Argentina mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula como método de *screening*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

- *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae)  
Nombre vulgar: Molle de beber.
- *Styphnolobium japonicum* L. Schott. (Fabaceae)  
Nombre vulgar: Sofora.
- *Schkuhria pinnata* (Lam) O.K. (Asteraceae)  
Nombre vulgar: Canchalagua.
- *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae) Nombre vulgar: Algarrobo blanco.
- *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae)  
Nombre vulgar: Espino Colorado.
- *Chenopodium multifidum* (Chenopodiaceae)  
Nombre vulgar: Paico.

### Preparación de los Extractos Acuoso (Infusión y cocimiento)

La infusión y el cocimiento son formas farmacéuticas extemporáneas preparadas por la acción de agua hervida sobre pequeños fragmentos secados al aire de hojas y ramas de la planta, acompañadas generalmente por frutos y flores.

En el caso del cocimiento, los principios activos son extraídos por ebullición en agua durante 10 minutos. Mientras que en el caso de la infusión, la extracción se realiza por el agregado de agua hervida a los fragmentos de la planta, dejándola actuar también en este caso, durante 10 minutos.

Posteriormente a su preparación las soluciones (10%p/v) fueron esterilizadas por filtración (filtro: 0,22 µm). Se realizaron las diluciones de las preparaciones a evaluar, las cuales fueron de: 10; 100; 1000 y 10000 µg de planta/ml.

### Exposición de las Células a los Extractos

Se obtuvo sangre entera de 3 dadores sanos por punción venosa en jeringa previamente heparinizada en condiciones de esterilidad. Se colocaron 10 µl de sangre en 1 ml de medio de cultivo: RPMI-1640 (GIBCO), al que se adicionó el extracto acuoso de la planta a evaluar en la correspondiente concentración. Se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron centrifugados y el botón celular fue resuspendido en 50 µl de medio de cultivo, para realizar la determinación de viabilidad mediada por fluorocromos y el ensayo de electroforesis de una sola célula.

### Estudio de Viabilidad Celular Mediado por Fluorocromos

Con la finalidad de detectar si los efectos sobre el ADN analizados por medio del Ensayo del Cometa se hallaban acompañados de efectos citotóxicos, la viabilidad celular fue determinada por medio del colorante vital diacetato de fluoresceína (FDA)/bromuro de etidio (BrEt).<sup>3</sup> Se preparó una solución fresca de FDA (30µl) en acetona (5 mg/ml), BrEt (200 µl) en buffer fosfato (200 µg/ml), agregándole, por último 4,8 ml. de buffer fosfato.

La sangre entera de los dadores fue centrifugada después de la exposición a los extractos acuosos y 25 µl del pellet fueron resuspendidos con 25 µl de la solución colorante. Se realizaron extendidos sobre portaobjetos y se protegieron con cubreobjetos. La viabilidad fue chequeada inmediatamente después del tratamiento.

Las células viables se visualizaron de color verde fluorescente, mientras que los núcleos teñidos de color naranja son indicativos de muerte celular. Se contabilizaron 200 células por individuo / extracto / concentración.

### Electroforesis de una sola Célula

La técnica<sup>4</sup> fue realizada sobre portaobjetos esmerilados, los cuales fueron cubiertos por una fina capa de 100 µl de agarosa de punto de fusión normal al 0,5% disuelta en buffer fosfato libre de calcio y magnesio. Posteriormente los preparados fueron cubiertos con cubreobjetos y llevados durante 10 minutos a 4°C hasta lograr la solidificación de la agarosa. Se tomaron entre 30000-200000 células (25 µl de la suspensión celular) control y tratadas con los diferentes extractos de los distintos dadores, en las respectivas concentraciones y fueron suspendidas en 10 µl de buffer fosfato y 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. Posteriormente, se removió el cubreobjeto y se colocó la suspensión celular sobre la primera capa de agarosa. Nuevamente se colocó el cubreobjetos para lograr una homogénea dispersión de la agarosa. Se incubó a 4°C hasta solidificación. A continuación se retiró el cubreobjetos y se colocó una tercera capa de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%. Se incubaron las laminillas hasta solidificación a 4°C durante 10 minutos y se retiró posteriormente el cubreobjetos.

Una vez finalizada la preparación de los extendidos, se los sometió a la acción de una solución de lisis (Stock: NaCl 2,5M; Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM; Tris 10 mM; Lauril sarcosinato de sodio 1%. Solución de trabajo: 40 ml sol. Stock + 400 µl Tritón x-100 + 5 ml DMSO) en frío. Se los incubó 1 hora a 4°C. A continuación, se colocaron los preparados en una cuba de electroforesis horizontal, en la cual se incubaron con buffer de corrida (1mM Na<sub>2</sub>EDTA - 300mM NaOH pH=13) durante 20 minutos, para lograr el desenrollamiento de la doble hebra de ADN. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 20 minutos a 25 volts. Luego, los preparados fueron lavados con buffer Tris de neutralización, para eliminar los restos de detergentes y álcalis que pudieran interferir con la coloración fluorescente. Posteriormente, se colorearon con 50 µl de bromuro de etidio en una solución de 2 µg/ml en agua destilada y fueron cubiertos con cubreobjetos. Cabe aclarar que todo el procedimiento descrito se llevó a cabo bajo luz amarilla, para evitar el daño adicional al ADN que se pueda generar durante el desarrollo de la metodología.

El análisis microscópico de los preparados se realizó en un microscopio epifluorescente con filtro de excitación de 505-560 nm con luz de mercurio de 100 w y filtro de barrido de 590 nm. La cuantificación del daño se realizó midiendo el largo de 100 cometas sucesivos (50 cometas / preparado / concentración / preparación / individuo, realizando la cuantificación por duplicado) por medio de un ocular graduado.

Otro punto importante de aclarar, es que para cada tratamiento realizado, se incluyeron controles positivos y negativos. El control positivo utilizado fue peróxido de hidrógeno 50 µM. Dicha sustancia es altamente oxidante e induce en el ADN roturas doble y simple cadena y sitios álcali lábiles. El control negativo fue agua destilada, diluyente utilizado en la preparación de los extractos.

Los resultados obtenidos fueron analizados estableciendo la categoría de daño hallada en cada individuo por cada concentración de extracto ensayado. Se establecieron cuatro categorías de daño, dependiendo del largo total del cometa: bajo (<20 µm); medio (20-40 µm); alto (40-80 µm) y células totalmente dañadas (>80µm). Una vez establecido el porcentaje de células en cada categoría, se calculó el Índice de Daño (N), por cada individuo, por cada concentración ensayada.

$$N = N^{\circ}\text{cél Cat I} + 2xN^{\circ}\text{cél Cat II} + 3xN^{\circ}\text{cél Cat III} + 4xN^{\circ}\text{cél Cat IV}$$
Una vez calculado el Índice de daño (N), se procedió al análisis exploratorio de los datos mediante el test de Varianza (ANOVA) de medidas repetidas.<sup>5,6</sup>

### RESULTADOS

Como se puede observar en los siete tratamientos realizados, la viabilidad obtenida fue mayor al 70%. De esta manera, se asegura que de existir daño al ADN, este será por interacción de los principios activos con el material genético y no por lisis o des-

Planta	Viabilidad (%) (valores promedios de los individuos analizados)					
	Control positivo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Control negativo (H <sub>2</sub> O)	1 µg/ml.	10 µg/ml.	100 µg/ml.	1000 µg/ml.
<i>Ch. multifidum</i> (cocimiento)	32,33	81,33	86,33	85,66	80,33	74,66
<i>Ch. multifidum</i> (infusión)	32,33	81,33	81,00	70,33	81,50	78,50
<i>L. molleoides</i>	32,33	81,33	87,00	85,00	86,50	87,00
<i>S. japonicum</i>	32,33	81,33	84,66	77,33	77,00	73,00
<i>S. pinnata</i>	32,33	81,33	79,66	83,33	75,00	84,00
<i>P. alba</i>	32,33	81,33	84,00	76,66	74,33	73,66
<i>S. sysimbriifolium</i>	32,33	81,33	84,00	87,00	86,00	86,50

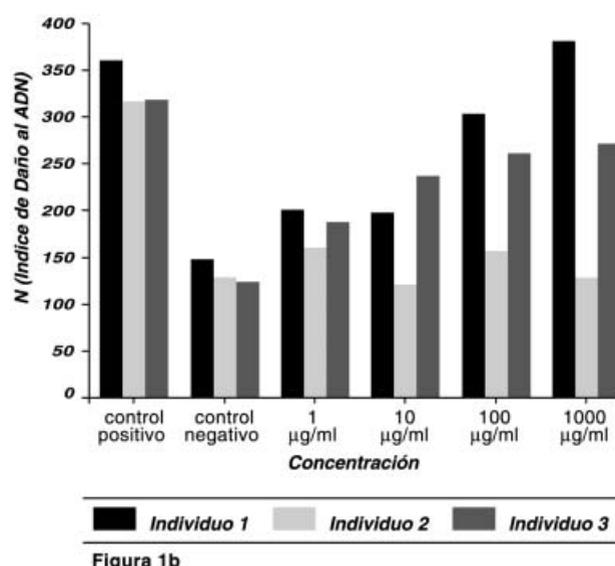
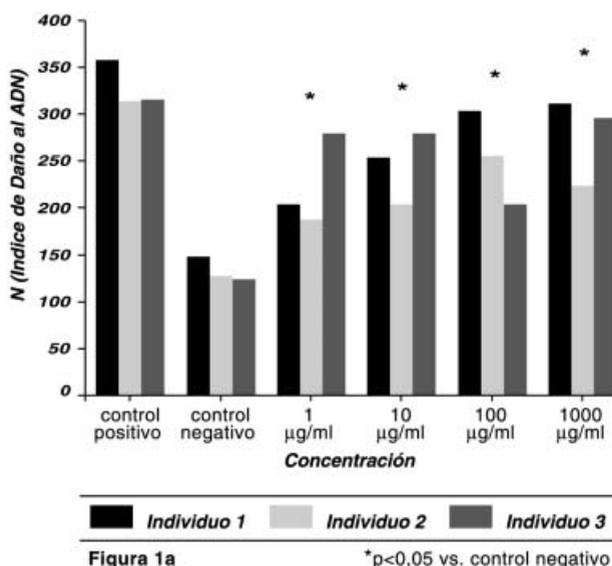
**Tabla 2.** Efecto de los Extractos Acuosa de Diferentes Plantas Medicinales sobre la Viabilidad Celular.

trucción de las membranas celulares (Tabla 2). Los resultados obtenidos en la evaluación del cocimiento de *Ch. multifidum*, mostraron un incremento en el daño producido al ADN. Esto se tradujo en un incremento estadísticamente significativo del índice de daño calculado ( $p < 0,05$ ) (Figura 1 a). El tratamiento realizado con la infusión de la misma planta al calcular el número N, detectó un incremento en el daño al ADN. Éste no llegó a ser estadísticamente significativo debido a la variación interindividual observada entre los donantes<sup>1</sup> (Figura 1 b). Se observó a simple vista que el individuo 2 no ha sido sensible al agregado del extracto

y probablemente por esta causa el resultado estadístico no ha sido significativo.

En el tratamiento realizado con el extracto acuoso (infusión) de *L. molleoides*, se detectó un incremento estadísticamente significativo del índice de daño al ADN ( $p < 0,01$ ). De esta manera, el largo de los cometas se incrementó al exponer a las células a mayores concentraciones del extracto, produciendo un aumento de las roturas de ADN doble y simple cadena (Figura 2).

En los tratamientos realizados con los extractos acuosa de *P. alba* (Figura 3a) y de *S. japonicum* (Figura 3b), no se observaron variaciones en el



**Figura 1.** Índice de Daño al ADN en tres dadores expuestos a *Chenopodium multifidum* L., cuantificado mediante el ensayo del cometa. a: Cocimiento; b: Infusión.

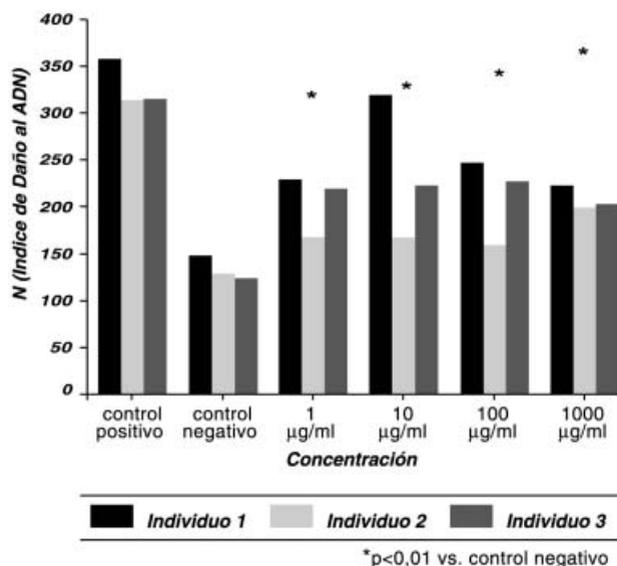


Figura 2. Electroforesis de una sola célula en linfocitos de sangre periférica de tres dadores expuestos a *Lithraea molleoides*.

largo de los cometas analizados. Se observó una gran variación en los diferentes individuos analizados, siendo el individuo 1 extremadamente sensible frente al agregado de cualquier extracto.

En el ensayo realizado con la infusión de *S. pinnata*, especie de la familia de las Asteraceae, los resultados evidenciaron daño genotóxico. El análisis exploratorio de los datos indicó que este incremento es estadísticamente significativo, con un  $p < 0,05$  (Figura 4).

En el tratamiento realizado con la infusión de *S. sysimbriifolium* (Solanaceae) también se detectó un aumento del largo de los cometas. Esta observación se traduce en un incremento estadísticamente significativo del índice de daño ( $p < 0,01$ ).

Esto sugiere que la molécula de ADN es susceptible a los principios activos presentes en el extracto acuoso analizado (Figura 5).

### DISCUSIÓN

Aunque las plantas medicinales poseen propiedades terapéuticas, y pueden ser utilizadas como quimiopreventivos para el tratamiento de neoplasias (elipticina, derivados indólicos, derivados fenólicos), algunas de ellas pueden poseer compuestos con propiedades no solo mutagénicas sino también carcinogénicas (quercetina, rutina o algunos constituyentes de especies exóticas).<sup>7</sup>

Los ensayos de *screening* en mutagenicidad, en una primera instancia, son utilizados como ensayos cualitativos sobre potenciales mutágenos. En una evaluación mutagénica, los resultados positivos pueden utilizarse de diferentes maneras. Entre ellas, la de mayor aplicación durante los últimos 20 años ha sido la de tomarlos como una evidencia de peso para predecir carcinogenicidad de compuestos.

Si bien la identificación de carcinógenos es importante, la evaluación de mutagenicidad no es un simple componente de este proceso, sino que es de fundamental ayuda en el asesoramiento de riesgo / beneficio frente a la exposición de diversas sustancias.<sup>8</sup>

El ensayo de electroforesis de una sola célula en condiciones alcalinas, es una herramienta muy promisoría en el estudio de daño inducido al ADN, por agentes químicos en células de mamíferos.<sup>4, 9-11</sup>

Se asume que la electroforesis en condiciones alcalinas detecta tanto roturas doble como simple cadena, aunque la naturaleza y el mecanismo del ensayo no se encuentra totalmente clarificado.<sup>12</sup>

El interés en el ensayo del cometa se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido a

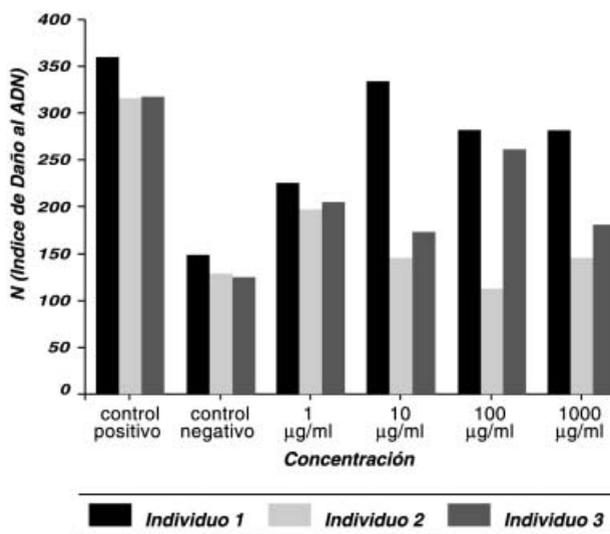


Figura 3a

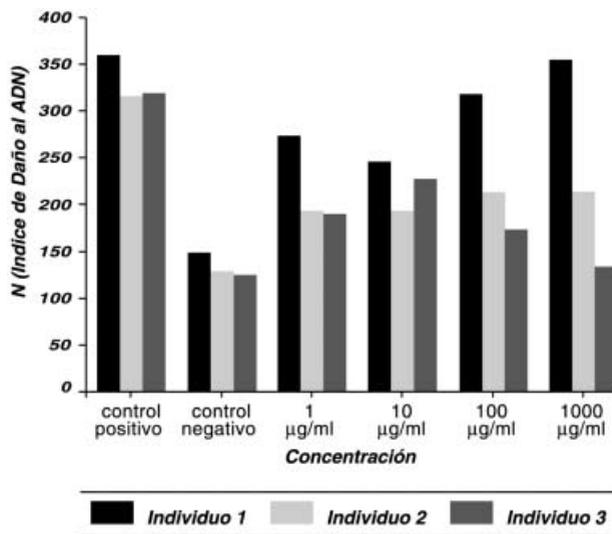


Figura 3b

Figura 3. Índice de daño al ADN en tres dadores cuantificado mediante el ensayo del cometa. a: *Prosopis alba*; b: *Styphnolobium japonicum*.

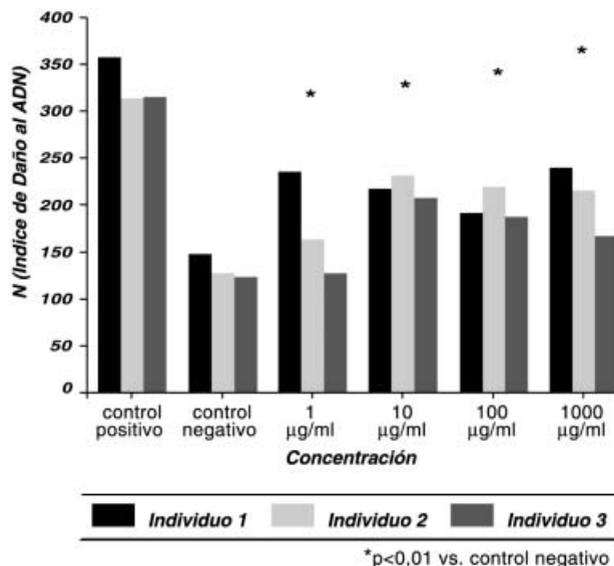


Figura 4. Electroforesis de una sola Célula en Linfocitos de Sangre Periférica de tres Dadores Expuestos a *Schkuhria pinnata*.

que ha demostrado ser un método extremadamente sensible en la detección del daño al ADN a nivel celular. Este ensayo está siendo considerado por la literatura como un método rápido, para predecir el daño genotóxico de un agente en diseños experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>13, 14</sup>

En el presente trabajo se observó una sustancial heterogeneidad en la distribución de la migración del ADN frente al agregado de los extractos. Esto indica un número variable de roturas simple cadena y sitios álcali-lábiles. Esta gran variación intercelular no podría haber sido detectada si el ensayo sólo identificara daño al material genético en poblaciones celulares.<sup>15</sup>

Una gran diversidad de grupos de investigación han evaluado el ensayo de electroforesis de una sola célula, en muestras de linfocitos de poblaciones expuestas, utilizándolo como método de *screening*. Estos estudios revelaron una considerable variación intra-individual. Esto se debe a la extrema sensibilidad de los linfocitos y sugiere una dificultad en la utilización de ADN proveniente de los mismos para la realización de biomonitoreos de poblaciones expuestas.<sup>16</sup>

En los resultados obtenidos en el ensayo del cometa, se evidenció que cuatro de las seis especies evaluadas indujeron un incremento de roturas en la doble hélice del ADN. Esto sugiere la presencia de sustancias tóxicas en los extractos acuosos de esas plantas medicinales (*Ch. multifidum*-Infusión y Cocimiento-; *L. molleoides*; *S. sysimbriifolium*, *S. pinnata*) (Figuras: 1, 2, 4 y 5).

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la infusión del *Ch. multifidum*, se observó una gran heterogeneidad en la respuesta, dependiendo de cada dador. Si observamos la figura 1 b, vemos que existe un efecto positivo, no llegando éste a ser estadísticamente significativo. Probablemente esto se deba a la ausencia de respuesta en

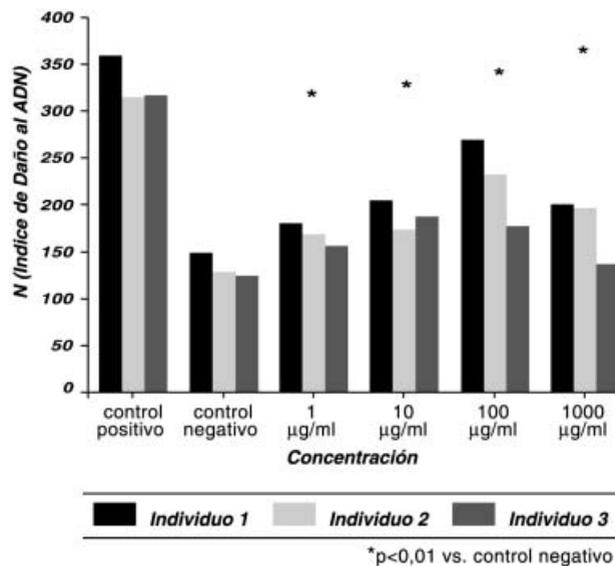


Figura 5. Electroforesis de una sola Célula en Linfocitos de Sangre Periférica de tres Dadores Expuestos a *Solanum sysimbriifolium*.

el individuo 2.

Estas variaciones interindividuales, como ya fue mencionado, están influenciadas fundamentalmente por dos mecanismos: la diferente susceptibilidad individual y la extrema sensibilidad de los linfocitos como sistema de ensayo.<sup>1, 17</sup>

Otros ejemplos de heterogeneidad en la respuesta se observaron en los resultados obtenidos con *P. alba* y *S. japonicum*, donde se evidencia que el individuo 1 es extremadamente sensible frente al agregado de un agente externo (Figura 3).

La cuantificación de las roturas de la cadena ADN en algunas ocasiones es utilizada como una medida de genotoxicidad, no sólo porque ellas *per se* puedan causar la muerte celular, sino por que probablemente este tipo de lesiones sean los precursores de las Aberraciones Cromosómicas.<sup>17, 18</sup>

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que los extractos acuosos evaluados no son inocentes frente a una evaluación toxicogenética de *screening*. Por consiguiente es necesario considerar el posible potencial tóxico de estas plantas medicinales y establecer una metodología para la protección de la población expuesta. Se necesitan obtener respuestas en el ámbito de la Salud Pública para regular el consumo masivo e indiscriminado de las plantas medicinales.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los subsidios UBACYT, B-046 y B-034, otorgados por la Universidad de Buenos Aires.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angelis K.J.; Dusinska M.; Collins A.R. (1999): **Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity**. Electrophoresis. 20 (10): 2133-8.
2. Östling, O.; Johanson, K.J. (1984): **Microelectrophoretic**

- study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 123: 291-298.
3. Hartmann, A.; Agurell, E.; Beevers, C.; Brendler-Schwaab S.; Burlinson, B.; Clay, P.; Collins, A.; Smith, A.; Speit G.; Thybaud, V.; Tice, R. (2003): **Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay.** 4th International Comet Assay Workshop. Mutagenesis.18(1): 45-51.
4. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. (1988): **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exp. Cell Res. 175: 184-191.
5. Anderson, D; Yu TW; Phillips, B.J.; Schmezer, P. (1994): **The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay.** Mut. Res. 307: 261-271.
6. Graphpad Instat. Software estadístico IBM PC compatible.
7. Hocman, G. (1989): **Prevention of cancer: vegetables and plants.** Comp. Biochem. Physiol. 93B(2): 201-212.
8. Dearfield, K.L. (1995): **Information requirements and regulatory approaches for heritable genetic risk assessment and risk communication.** Mutat. Res. 350: 35-40.
9. Singh, N.P.; Danner, D.B.; Tice, R.R.; McCoy, M.T.; Collins, G.D.; Schneider, E.L. (1989): **Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm.** Exp. Cell Res. 184: 461-470.
10. Tice, R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F.; (2000): **Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing.** Environ. Mol. Mutagen. 35(3): 206-21.
11. Fairbairn, D.W.; O'Neill, K.L.; Standing, M.D. (1993): **Application of confocal laser scanning microscopy to analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage in human cells.** Scanning. 15: 136-139.
12. Collins, A.R. (1992): **Workshop on single cell gel electrophoresis (the comet assay) held as part of the UKEMS/DNA repair network joint meeting.** Swansea, March. Mutagenesis. 7(5): 357-358.
13. Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L. (1995): **The comet assay: A comprehensive review.** Mutat. Res. 339: 37-59.
14. Monteith, D.K.; Vanstone, J. (1995): **Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage.** Mutat. Res. 345: 97-103.
15. Singh, N.P.; Tice, R.R.; Stephens, R.E.; Schneider, E.L. (1991): **A microgel technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides.** Mutat. Res. 252: 289-296.
16. Ross, G.M.; Mc Millian, T.J.; Wilcox, P.; Collins, A.R. (1995): **The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications.** Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. Mutat. Res. 337: 57-60.
17. Tice R.; Strauss G.H. (1995): **The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans.** Stem Cells. 13 (Suppl 1): 207-14.
18. Natarajan, A.T.; Obe, G.; van Zeeland, A.A.; Palitti, F.; Meijers, M.; Verdegaal-Immerzeel, E.A.M. (1980): **Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations II. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle.** Mutat. Res. 69: 293-305.
19. Sobels, F.H. (1989): **Models and assumptions underlying genetic risk assessment.** Mutat. Res. 212: 77-89.

## CUANTIFICACIÓN DE BRODIFACOU, BROMADIOLONE Y DIFENACOU EN SUERO HUMANO POR HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA Y FLUOROMÉTRICA

Valentina Olmos, Silvia Carolina Lenzken, Myriam del Carmen Paz, Nancy Mónica Olivera, Sergio Domínguez, Clara Magdalena López(\*) y Otmario Enrique Roses

Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junin 956, 7º piso (CP 1113) Tel/Fax: 4964-8283/84. Correo electrónico: cmlopez@ffyba.uba.ar

**RESUMEN.** Olmos, V.; Lenzken, S.C.; Paz, M.; Olivera, N.M.; Domínguez, S.; López, C.M. y Roses, O.E. **Cuantificación de Brodifacoum, Bromadiolone y Difenacoum en Suero Humano por HPLC con Detección Ultravioleta y Fluorométrica.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1): 9-14.* El uso de los raticidas anticoagulantes de segunda generación, llamados superwarfarínicos, se ha incrementado notablemente en la Argentina en estos últimos años y han causado numerosas intoxicaciones accidentales e intencionales. Son antagonistas de la vitamina K<sub>1</sub> y, en consecuencia, afectan la coagulación tanto en animales como en humanos. En este trabajo se describe un método de investigación y cuantificación de bromadiolone, difenacoum y brodifacoum en suero mediante HPLC en fase reversa con detección ultravioleta (254 nm) y fluorométrica (excitación: 248 nm y emisión: 385 nm). Los superwarfarínicos se aislaron mediante una extracción con una mezcla cloroformo-acetona (1:1, v/v) y luego se resolvieron con una fase móvil isocrática en diez minutos. La recuperación de la extracción estuvo entre 51 y 74 %. Los límites de detección con detector de fluorescencia estuvieron comprendidos en un rango de 5,7 a 35,6 ng/ml, y con detector ultravioleta de 11,7 a 41,6 ng/ml.

En las condiciones de trabajo no se observó interferencia de la vitamina K<sub>1</sub> ni de los raticidas anticoagulantes de primera generación warfarina y coumatetralyl.

**ABSTRACT.** Olmos, V.; Lenzken, S.C.; del Carmen Paz, M.; Olivera, N.M.; Domínguez, S.; López, C.M. and Roses, O.E. **Quantification of Brodifacoum, Bromadiolone and Difenacoum in Human Serum by HPLC with Ultraviolet and Fluorometric Detection.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1): 9-14.* The use of second generation anticoagulant rodenticides often called superwarfarins, has been notably increased in Argentina in the past few years. They have been responsible of many accidental and intentional poisoning episodes. They are antagonists of vitamin K<sub>1</sub> and, in consequence, they affect the coagulation process in animals and humans. We describe a method for the investigation and quantitation of bromadiolone, difenacoum and brodifacoum in serum by reverse phase HPLC with ultraviolet (254 nm) and fluorometric (excitation: 248 nm and emission: 385 nm) detection. Superwarfarins were extracted through a simple chloroform-acetone (1:1, v/v) extraction system and they were separated with an isocratic mobile phase in ten minutes. Extraction recoveries were between 51 and 74 %. The superwarfarins were detected down to 5,7 to 35,6 ng/ml for fluorometric detection and down to 11,7 to 41,6 ng/ml for ultraviolet detection. No interferences were observed with vitamin K<sub>1</sub> or first generation anticoagulant rodenticides coumatetralyl and warfarin.

**Palabras clave:** superwarfarínicos, suero, HPLC, Brodifacoum, Bromadiolone, Difenacoum.

**Key words:** superwarfarins, serum, HPLC, Brodifacoum, Bromadiolone, Difenacoum.

**Palavras-chaves:** super-cumarinas, soro, HPLC, Brodifacoum, Bromadiolone, Difenacoum.

### INTRODUCCIÓN

Los raticidas anticoagulantes de segunda generación, llamados superwarfarínicos (SW), se desarrollaron a partir de la aparición de roedores resistentes a la warfarina. Estos compuestos actúan más rápidamente, resultan más potentes y poseen una vida media más prolongada que la warfarina.<sup>1,2</sup> Asimismo, son antagonistas de la vitamina K<sub>1</sub> y actúan principalmente en hígado.<sup>3</sup> Ejercen su efecto tóxico inhibiendo las enzimas vitamina K<sub>1</sub> 2,3 epóxido reductasa y vitamina K<sub>1</sub> reductasa (*Figura 1*) y, de esta forma, disminuyen la producción de los factores de la coagulación vitamina K dependientes II, VII, IX y X.<sup>1-5</sup> La principal vía de ingreso al organismo humano es la oral, aunque se pueden absorber por vía dérmica y por vía inhalatoria.<sup>3</sup> Luego de una ingesta se eliminan principalmente por heces.<sup>3</sup>

Las intoxicaciones pueden ser accidentales o intencionales y, en general, cursan con disminución de la actividad de protrombina que, en casos graves, ocasiona sangrados intensos.

El tratamiento de la intoxicación involucra: a) procedimientos generales de descontaminación gástrica<sup>3</sup> cuando puedan ser aplicables, b) terapia con

vitamina K<sub>1</sub>,<sup>3,6-8</sup> c) transfusión de sangre o plasma fresco en los casos de sangrado intenso o de actividad de la protrombina menor al 20%.<sup>3,7,8</sup>

En la Argentina hay actualmente más de 20 formulaciones que contienen SW como principios activos y más del 80% de ellos contienen brodifacoum, bromadiolone o difenacoum (*Tabla 1*).

A partir de 1998 los casos de sospecha de intoxicación con estos compuestos han ido en aumento, hecho que ha inducido a desarrollar métodos analíticos para la investigación de SW en medios biológicos.

El sistema que se presenta permite cuantificar los SW en suero e incluye una extracción líquido-líquido y una posterior identificación de brodifacoum, bromadiolone y difenacoum en el extracto mediante HPLC con detección ultravioleta (UV) y fluorométrica (FP).

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Drogas sólidas:** Acido cítrico monohidrato p.a. (Merck) y fosfato dibásico de sodio p.a. (Mallinckrodt).

Los testigos de brodifacoum, difenacoum y bromadiolone fueron donados por Zéneca Agrochemical.

(\*) Autor a quien dirigir la correspondencia

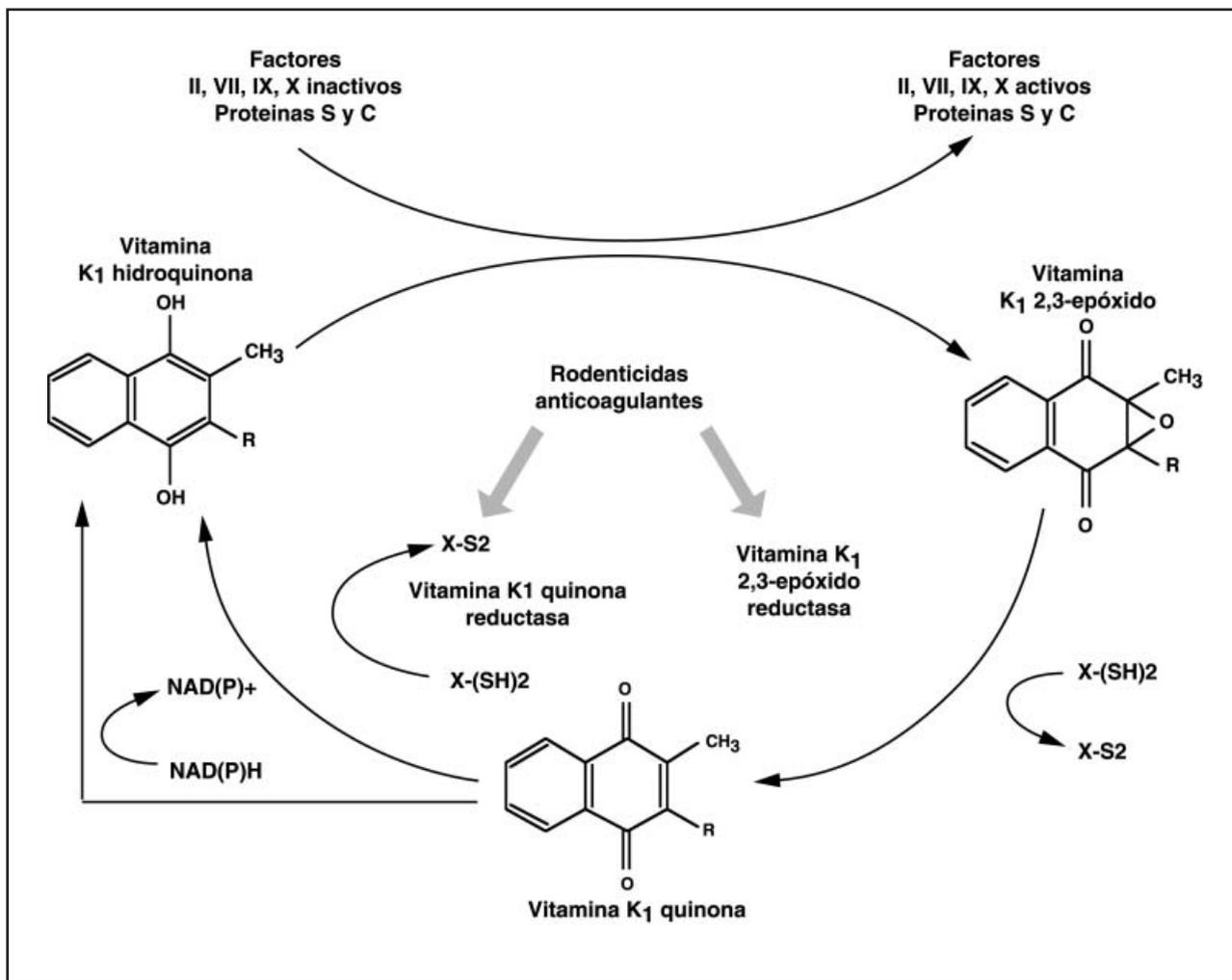


Figura 1. Principales sitios de acción de los rodenticidas anticoagulantes en el ciclo de la vitamina K1. Modificado de (3)

**Drogas líquidas:** Acetona p.a., cloroformo p.a., diclorometano p.a., metanol p.a. y ácido acético glacial GR (Merck), metanol grado HPLC y agua grado HPLC (JT Baker) y ácido fosfórico p.a. (Mallinckrodt).

### Preparación de los reactivos

**Buffer citrato-fosfato pH 5,5:** disolver 3,5598 g de fosfato dibásico de sodio en 100 ml de agua (solución A) y 1,0507 g de ácido cítrico en 50 ml de agua (solución B). A 20 ml de la solución A agregarle la solución B hasta un pH de 5,5.

**Soluciones patrones y sueros enriquecidos:** se prepararon soluciones madres de 1 mg/ml de brodifacoum, difenacoum, bromadiolone en diclorometano:metanol (60:40 v/v). Con cada una de ellas se prepararon soluciones de trabajo en metanol en el rango de 150 a 5.000 ng/ml.

Las muestras de suero se obtuvieron a partir de muestras de sangre de sujetos voluntarios sanos. Éstas se dejaron exudar durante una hora a 37 °C y se centrifugaron a 3.000 rpm.

Los sueros enriquecidos se prepararon agregando

una mezcla de los tres SW para obtener concentraciones finales entre 30 y 2.000 nanogramos por cada mililitro de suero.

**Instrumental y condiciones de trabajo:** se utilizó un cromatógrafo líquido Jasco PU-980, provisto un inyector automático AS-950 y detectores ultravioleta UV-975 y de fluorescencia FP-920. La columna cromatográfica empleada fue una Partisil 5 ODS-3 RAC II 4,6 x 100 mm (Whatman). La fase móvil fue metanol/agua/ácido acético glacial (792:200:8) y el flujo de trabajo fue de 0,7 ml/min.

Las longitudes de onda fueron: a) detector UV: 254 nm; b) detector FP: excitación 248 nm y emisión 385 nm.

El volumen de inyección fue de 20 microlitros. Las corridas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente.

### Procedimiento

En un tubo con tapa esmerilada se colocaron 1 ml de suero y 0,5 ml de buffer citrato-fosfato pH 5,5; se mezcló en agitador mecánico (tipo Vortex) durante 10 segundos y se agregaron 6 ml de una

Nombre comercial	Denominación y tipo de formulado	Composición	Tipo de venta
RATAK	Cebo raticida rodenticida en granos	Difenacoum 0,005%	LIBRE
RODILON P	Cebo raticida rodenticida en pellets	Difethialone 0,0025%	LIBRE
RODILON P	Cebo raticida rodenticida en pellets	Difethialone 0,0025%	PROFESIONAL
ROSENBUSCH	Cebo raticida rodenticida en granos	Bromadiolone 0,005%	LIBRE
ROSENBUSCH	Cebo raticida rodenticida en granos	Bromadiolone 0,005%	PROFESIONAL
QUICK KILLER PLUS C	Raticida rodenticida	Brodifacoum 0,005%	LIBRE
SUPER QUICK KILLER C	Raticida rodenticida	Bromadiolone 0,005%	LIBRE
QUICK KILLER PLUS BP	Raticida rodenticida	Brodifacoum 0,005%	LIBRE
GLEXRAT	Raticida rodenticida	Bromadiolone 2,5% (0,2%)	PROFESIONAL
GLEXRAT	Raticida rodenticida	Bromadiolone 2,5% (0,2%)	LIBRE
TOMCAT PELLETS	Cebo raticida rodenticida en pellets	Bromadiolone 0,005%	LIBRE
TOMCAT BLOX	Cebo raticida rodenticida en bloques	Bromadiolone 0,005%	LIBRE
JAGUAR BLOX	Cebo raticida rodenticida en bloques	Brodifacoum 0,005%	PROFESIONAL
JAGUAR PELLETS	Cebo raticida rodenticida en pellets	Brodifacoum 0,005%	PROFESIONAL
JAGUAR PELLETS	Cebo raticida rodenticida en pellets	Brodifacoum 0,005%	LIBRE
JOHNSON RAID	Raticida rodenticida	Brodifacoum 0,005%	LIBRE
KLERAT PELLETS	Cebo raticida rodenticida en pellets	Brodifacoum 0,005%	LIBRE
KLERAT PELLETS	Cebo raticida rodenticida en pellets	Brodifacoum 0,005%	PROFESIONAL
JOHNSON WAX	Raticida rodenticida en granos	Brodifacoum 0,005%	PROFESIONAL
ULTRA PLUS	Cebo raticida rodenticida granulado	Brodifacoum 0,005%	PROFESIONAL
ULTRA PLUS	Cebo raticida rodenticida granulado	Brodifacoum 0,005%	LIBRE

Tabla 1. Rodenticidas de II generación comercializados en la Argentina.

Fuente: Departamento de Productos de Uso Doméstico- Servicio de Insecticidas y Raticidas del Instituto Nacional de Alimentos (INAL).

mezcla cloroformo:acetona (1:1, v/v). La extracción se realizó colocando el tubo, tapado y asegurado, en un agitador rotatorio durante 30 minutos<sup>9</sup>. Luego se centrifugó durante 3 minutos a 3.000 rpm. Se tomaron 4,5 ml de la fase clorofórmica y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37°C.

El extracto se reconstituyó con 200 microlitros de metanol para proceder a la inyección en el cromatógrafo.

#### Ensayo de recuperación

Se realizaron ensayos de recuperación con dos lotes de sueros enriquecidos (n=7) con 500 y 1.000 ng/ml de la mezcla de SW. En cada ensayo se procesaron las muestras por triplicado y un blanco de suero, con el propósito de establecer la recuperación promedio y la desviación estándar.

#### Curvas de calibración en suero

Las curvas se prepararon enriqueciendo sueros en seis niveles de concentración 30, 50, 100, 500, 1.000 y 2.000 ng/ml para el brodifacoum y difenacoum y 30, 50, 250, 500, 1.000 y 2.000 ng/ml para el bromadio-

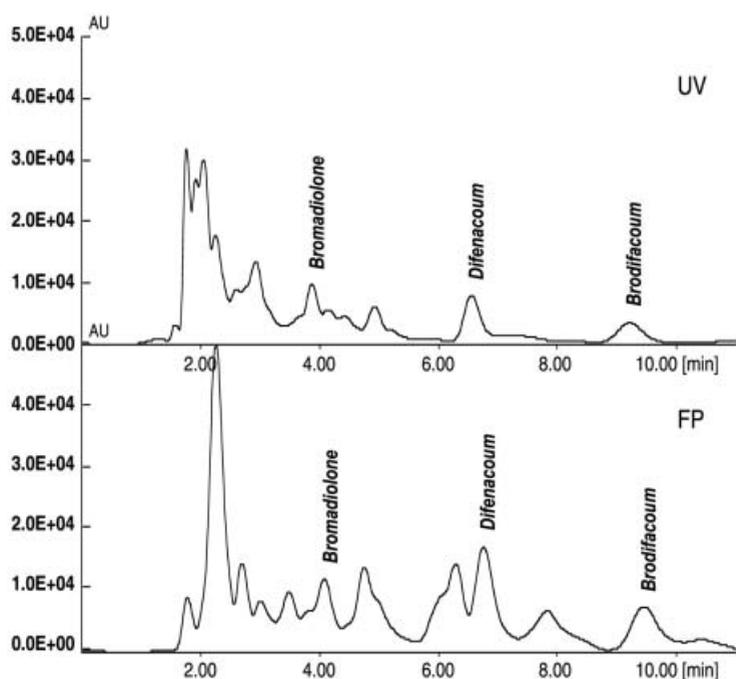


figura 2. Cromatogramas con detección ultravioleta (UV) y con detección fluorométrica (FP) de suero humano enriquecido con bromadiolone, difenacoum y brodifacoum (500 ng/ml).

lone. Los sueros se procesaron por triplicado y las curvas se construyeron por el método de los cuadrados mínimos.

### RESULTADOS

La cromatografía en fase reversa permitió resolver la mezcla de bromadiolone, difenacoum y brodifacoum con un sistema isocrático en 10 minutos (Figura 2). En las condiciones de trabajo descritas los factores de capacidad, selectividad y resolución del sistema estuvieron entre 1,47 y 4,88; 1,53 y 3,32; 3,8 y 8,2 respectivamente (Tabla 2).

La identificación de los SW se realizó por comparación del tiempo de retención y del espectro ultravioleta con el estándar correspondiente.

### Extracción y recuperación

La recuperación promedio de estos compuestos

Rodenticida	k'	$\alpha$	R
Bromadiolone (1)	1,47±0,01	2,16 (1,2)	6,0 (1,2)
Difenacoum (2)	3,18±0,03	1,53 (2,3)	3,8 (2,3)
Brodifacoum (3)	4,88±0,04	3,32 (3,1)	8,2 (1,3)

Tabla 2. Factores de capacidad (k'), selectividad ( $\alpha$ ) y resolución (R) para bromadiolone, difenacoum y brodifacoum.

Rodenticida	PRP	DE
Bromadiolone	51,29	9,52
Difenacoum	58,56	9,79
Brodifacoum	74,40	7,86

Tabla 3. Porcentaje de recuperación promedio (PRP) de los superwarfarínicos y desvío estándar (DE).

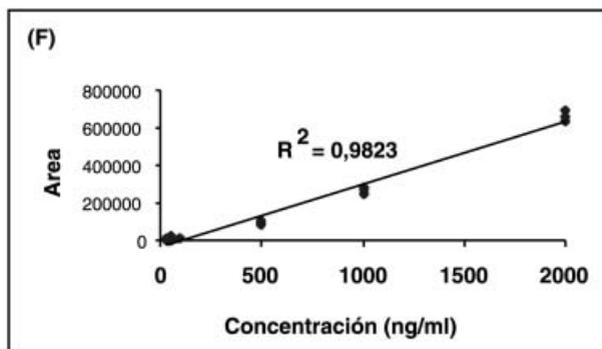
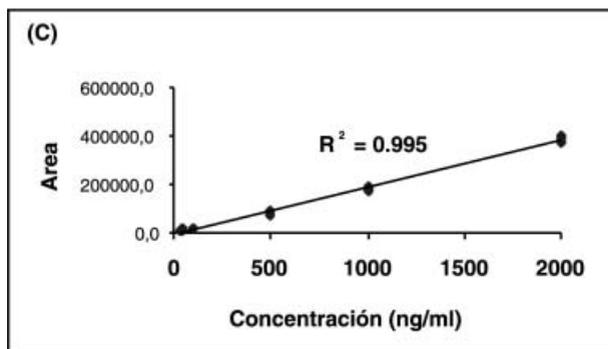
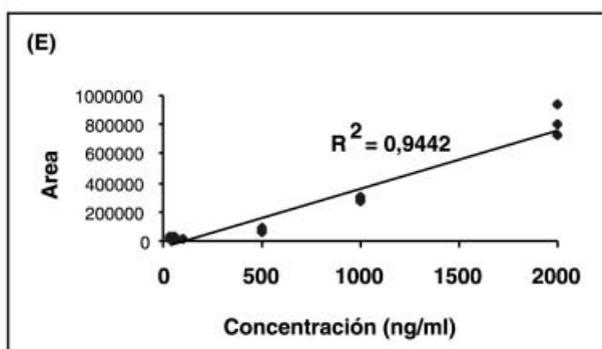
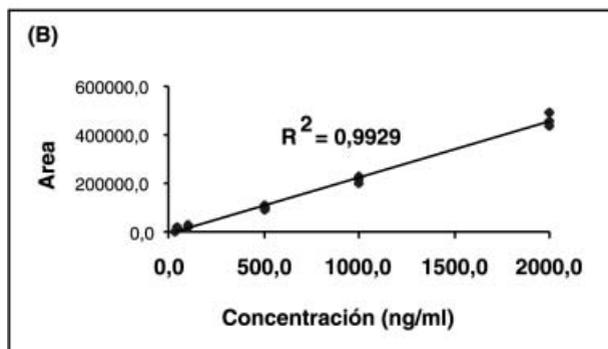
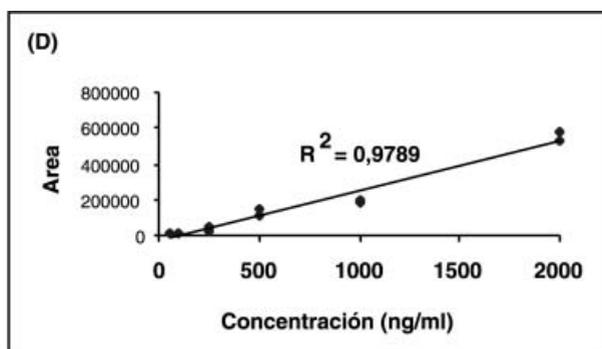
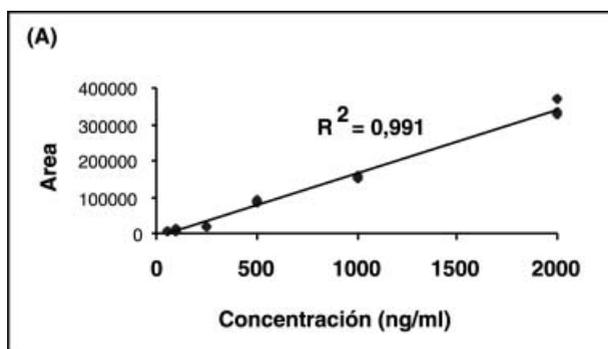


Figura 3. Curvas de calibración para bromadiolone, difenacoum y brodifacoum en suero con detección UV (A, B y C) y con detección FP (D, E y F)

Rodenticida	LD UV (ng/ml)	LC UV (ng/ml)	LD FP (ng/ml)	LC FP (ng/ml)
Bromadiolone	41,6	109,0	25,8	64,4
Difenacoum	11,7	47,2	35,6	41,3
Brodifacoum	45,0	113,8	5,7	17,5

**Tabla 4.** Límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) de los diferentes superwarfarínicos en suero con detección ultravioleta (UV) y fluorométrica (FP).

fue establecida con la mezcla cloroformo:acetona (1:1, v/v) ensayada (Tabla 3) y, en estas condiciones, el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo para el brodifacoum (74,40%).

### Linealidad

Se realizaron las curvas de calibración en suero para bromadiolone, difenacoum y brodifacoum en un rango de 30 a 2.000 ng/ml. Las curvas mostraron linealidad en el rango de concentraciones ensayadas (Figura 3). Se obtuvo una correlación mejor con detección UV ( $R^2 > 0,9910$ ) que con detección FP ( $R^2 > 0,9442$ ).

### Sensibilidad

Se establecieron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) en suero con detección UV y FP para los tres SW (Tabla 4).

La mayor sensibilidad se obtuvo con detección FP que fue de 25,8; 35,6 y 5,7 ng/ml para bromadiolone, difenacoum y brodifacoum respectivamente. Los LD y LC para cada compuesto se estimaron a partir de la curva de regresión, por extrapolación a concentración cero.<sup>10</sup>

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los compuestos warfarínicos introducidos en el mercado en los primeros años de la década del 50 han contribuido notablemente al control de los roedores. Si bien poseen estructuras químicas diferentes el efecto que producen en los animales es el mismo: impiden la coagulación de la sangre provocando la muerte por hemorragia.

Con respecto a los rodenticidas que los precedieron (cianuro, talio, etc.) son presentados como más efectivos y seguros.

Sin embargo, cada año se describen en la bibliografía casos de intoxicaciones humanas<sup>11-17</sup> como consecuencia de la ingestión accidental o intencional de SW. Las intoxicaciones accidentales generalmente se producen en niños sin presentar, por lo común, síntomas clínicos o alteraciones de la coagulación,<sup>13</sup> mientras que las intoxicaciones como consecuencia de ingestas deliberadas son frecuentes en adultos y cursan con coagulopatías prolongadas<sup>14, 15</sup> que en algunos casos llevan a la muerte.<sup>16, 17</sup> Dada la gravedad del cuadro clínico que presentan los intoxicados con SW y la complejidad de su tratamiento es útil contar con un método analítico que permita identificarlos en la sangre.

El método presentado permite identificar y cuantificar en suero bromadiolone, difenacoum y brodifacoum con una sensibilidad inferior a los 40 ng/ml. En su desarrollo se ensayaron varios sistemas de extracción de los SW en suero: a) extracción sólido-líquido en columnas Bakerbond C18 empleando mezcla de cloroformo:acetona (1:1 v/v) o metanol como solventes de elución; b) extracción líquido-líquido con acetonitrilo, cloruro de metileno, acetona o mezcla de cloroformo:acetona (1:1 v/v). La mezcla cloroformo:acetona (1:1 v/v) descrita por Kuijpers *et al*<sup>9</sup> resultó ser la más adecuada para efectuar la extracción líquido-líquido de brodifacoum, bromadiolone y difenacoum, aunque se obtuvo una recuperación inferior a la informada por ellos.

La fase móvil fue modificada a partir de la descripción para brodifacoum técnico en el "Esquema de Evaluación de Plaguicidas" de la OMS (WHOPES),<sup>18</sup> incrementando la proporción de agua de 5 a 20 % a expensas del metanol, lo que permitió una resolución excelente de la mezcla de los tres SW ensayados.

A diferencia del sistema descrito por Kuijpers<sup>9</sup> este sistema permitió cuantificar bromadiolone, difenacoum y brodifacoum sin separarlos en isómeros cis-trans ya que no habría diferencia significativa en la actividad de estos isómeros.<sup>19</sup>

Si bien la detección fluorométrica permite una mayor sensibilidad para el bromadiolone y el brodifacoum, en nuestra experiencia analítica la selectividad del detector UV fue mayor. El sistema ensayado permite cuantificar de un modo simple y rápido los SW que más frecuentemente están relacionados con intoxicaciones en la Argentina, abarca un amplio rango de concentraciones ya que ha mostrado linealidad hasta 2.000 ng/ml de suero. En las condiciones de trabajo no se observó interferencia de la vitamina K<sub>1</sub>, antídoto utilizado en los casos de intoxicación por estos compuestos, ni de los raticidas anticoagulantes de primera generación warfarina y coumatetralyl.

Aunque la incidencia de la intoxicación por SW en la Argentina es baja en relación con otros tóxicos, la investigación debería realizarse en todos los pacientes con coagulopatías de origen dudoso que responden a la terapia con vitamina K<sub>1</sub>.

La posibilidad de cuantificar estas sustancias permite estimar la evolución en el tiempo de los niveles de SW en suero y así optimizar la terapia con vitamina K<sub>1</sub> que, en general, suele ser prolongada y muy costosa.

### Agradecimiento

Al Licenciado Pablo Nicolini de Zéneca Agrochemical. Este trabajo ha sido realizado con fondos aportados por el GENATOXA.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Park, B.K. and Leck, J.B. (1982). **A comparison of vitamin K antagonism by warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit.** *Biochem. Pharmac.* 31(22): 3635-3639

2. Leck, J.B. and Park, B.K. (1981). **A comparative study of the effects of warfarin and brodifacoum on the relationship between vitamin K<sub>1</sub> metabolism and clotting factor activity in warfarin-susceptible and warfarin-resistant rats.** Biochem. Pharmacol. 30: 123-27
3. International Programme on Chemical Safety (1995). **Environmental Health Criteria Nº 175. Anticoagulant Rodenticides.** World Health Organization, Geneva.
4. Breckenridge, A.; Leck, J.B.; Serlin, M.J. and Wilson, A. (1978). **Mechanisms of action of the anticoagulants warfarin, 2-chloro-3-phytylnaphtoquinone (CL-K), acenocoumerol, brodifacoum and difenacoum in the rabbit.** Br. J. Pharmacol. 64: 339
5. Ecobichon, D.J. (1995). **Toxic Effects of Pesticides. Casarett & Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons.** Klaassen, C.D. (ed). McGraw-Hill, 5th Ed. New York, 643 pp.
6. Hui, C.H.; Lie, A.; Lam, C.K. and Bourke, C. (1996). **Superwarfarin poisoning leading to prolonged coagulopathy.** Forensic Sci. Int. 78: 13-18
7. Tecimer, C. and Tam, L.Y. (1997). **Surreptitious superwarfarin poisoning with brodifacoum.** Southern Medical Journal 90 (10): 1053-1055
8. Barlow, A.M.; Gay, A.L. and Park, B.K. (1982). **Difenacoum (Neosorexa) poisoning.** BMJ 285: 541.
9. Kuijpers, E.A.P.; den Hartigh, J.; Savelkoul, T.J.F. and de Wolff, F.A. (1995). **A method for the simultaneous identification and quantitation of five superwarfarin rodenticides in human serum.** J. Anal. Toxicol. 19: 557-562.
10. Quattrocchi, O.A.; Abelaira de Andrizzi, S.I. y Laba, R.F. (1992). **Validación de Métodos. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.** O. Quattrocchi, S. Abelaira y R Laba (ed) Buenos Aires, 301 pp.
11. Smolinske, S.C.; Scherger, D.L.; Kearns, P.S.; Wruk, K.M.; Kulig, K.W.; and Rumack, B.H. (1989). **Superwarfarin Poisoning in Children: a Prospective Study.** Pediatrics 84 (3): 490-4
12. Watts, R.G.; Castleberry, R.P. and Sadowski, J.A. (1990). **Accidental Poisoning with a Superwarfarin Compound (Brodifacoum) in a Child.** Pediatrics 86 (6): 883-7
13. Chua, J.D. and Friedenber, W.R. (1998). **Superwarfarin Poisoning.** Arch. Intern. Med. 158: 1929-1932.
14. Lipton, R.A. and Klass, E.M. (1984). **Human ingestion of a superwarfarin rodenticide resulting in a prolonged anticoagulant effect.** JAMA 252 (21): 3004-3005.
15. Stanton, T.; Sowray, P.; McWaters, D.; Mount, M. (1988). **Prolonged Anticoagulation with Long-acting Coumarin Derivatives: Case Report of a Brodifacoum Poisoning with Pharmacokinetic Data.** Blood 72(suppl1):310a Abstract.
16. Routh, C.R.; Triplett, D.A.; Murphy, M.J.; Felice, L.J.; Sadowski, J.A. and Bovill, E.G.T. (1991). **Superwarfarin ingestion and detection.** American Journal of Hematology 36: 50-54.
17. Palmer, R.B.; Alakija, P.; de Baca, J.E.C. and Nolte, K.B. (1999). **Fatal brodifacoum rodenticide poisoning: autopsy and toxicologic findings.** J. Forensic Sci. 44 (4): 851-855.
18. World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) [en línea] **Control of Tropical Diseases.** Actualizado el 1 de septiembre del 2000. <[http://www.who.int/ctd/docs/whopes/new\\_docs/full\\_spec/brodifacoum.pdf](http://www.who.int/ctd/docs/whopes/new_docs/full_spec/brodifacoum.pdf)> [consulta 25 de noviembre de 2003]
19. IPCS INCHEM [en línea] **Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. Poison Information Monographs. International Programme of Chemical Safety** <<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim077.htm>> [consulta 25 de noviembre de 2003]

## ADOLESCENTES CON CUADROS NEUROLÓGICOS E HIPERAMONIEMIA, ASOCIADO AL ANTECEDENTE DE INGESTIÓN DE JUGOS DE FRUTA SEMI-SINTÉTICOS

Juan Carlos Piola (\*), Daniel Carlos Ezpeleta, Dora Beatriz Prada, Marcela Evangelista.

Servicio de Toxicología del Sanatorio de Niños (Sertox). Alvear 858, PB "A" (2000), Rosario, Argentina.  
TEL/FAX 0341-4480202. E mail: sertox@sertox.com.ar - Web: www.sertox.com.ar

**RESUMEN.** Piola, J.C.; Ezpeleta, D.C.; Prada, D.B.; Evangelista, M. **Adolescentes con cuadros neurológicos e hiperamoniemia, asociado al antecedente de ingestión de jugos de fruta semi-sintéticos.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1):15-18.* El objetivo de este trabajo es mostrar la dificultad de interpretar un cuadro clínico no descrito anteriormente y postular que la ingestión alimentaria de jugos de fruta semi-sintéticos con elevado contenido amoniacal puede provocar cuadros neurológicos. Se presentan tres pacientes varones, uno de 12 años y dos de 13 años, que ingresaron a la Unidad de Terapia Intensiva del Sanatorio de Niños, Rosario, Argentina, en 1994, con depresión del sensorio y/o convulsiones, y presentaron cifras elevadas de amonio en sangre (hiperamoniemia). Los exámenes neurológicos realizados no aportaron otros datos específicos y los estudios bacteriológicos y virológicos negativos. Como antecedente en común referían la ingestión reciente, minutos a horas, de jugos de fruta semi sintéticos envasados en envases pequeños de plásticos individuales (sachet) o como concentrado en bidones. Los resultados de los análisis de los jugos, efectuados con el método N° 28 (*Federation International Des Productours de Jus de Fruit*), mostraron concentraciones elevadas de nitrógeno amoniacal. La presunción de que la hiperamoniemia podría deberse en estos pacientes a una causa exógena, como la ingestión de jugos, se basó en la ausencia de alteraciones hepáticas y/o metabólicas y la normalización del cuadro clínico en 24 horas. Consideramos que la ingestión de jugos de fruta semi-sintéticos con elevado contenido amoniacal y amplia absorción, pueden provocar cuadros neurológicos (hipertonía y convulsiones) en seres humanos y que los precursores de amoniaco como la urea, pueden ocasionar efectos tóxicos en el sistema nervioso central en animales según la bibliografía consultada.

**ABSTRACT.** Piola, J.C.; Ezpeleta, D.C.; Prada, D.B.; Evangelista, M. **Adolescents with hyperammonemia and neurological symptoms, associated to ingestion of synthetic fruit juices.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1):15-18.* The aim of this work is to show the difficulty to interpret a clinical picture not published previously and to postulate that the food ingestion with elevated ammonia content can cause neurological symptoms. We report the case of three male patients, one 12 years' old and two 13 years' old, that entered to the Intensive Care Unit of the Sanatorio de Niños, Rosario, Argentina, in 1994, with depression of central nervous system and/or convulsions and elevated ammonium in blood (hyperammonemia). Neurological studies were normal and the bacteriological studies were negative. As antecedent in common they referred the recent consumption (minutes to hours) of semi synthetic juices of fruit bottled in small plastics containers (sachet) or as concentrate, in barrels. Results of the analysis performed on juices (method N° 28, Federation International Des Productours de Jus de Fruit) showed high ammonia nitrogen concentrations. The presumption that hyperammonemia could be due to an exogenous cause, as the consumption of juices, was supported by the absence of metabolic or liver diseases and the normalization of the clinical picture in 24 hours. We consider that the semi-synthetic fruit juices consumption with high content of ammonia compounds can cause neurological pictures since the knowledge that diets with excess of ammonium compounds, or precursors of ammonia like urea, can produce toxicity at the central nervous system in animals. The ample ammonia compound absorption in human beings can produce convulsions, also.

**Palabras clave:** hiperamoniemia-adolescentes-convulsiones-jugos de fruta.

**Key words:** hiperamoniemia-adolescents-convulsions-fruit juices.

### INTRODUCCIÓN

Si se considera el número siempre creciente de sustancias químicas que pueden producir cuadros tóxicos y la diversidad de sus usos y procesos, es posible entender que en el ejercicio de la toxicología clínica se presenten situaciones nuevas, hecho que genera dificultades para el manejo de los pacientes pero a la vez permite avanzar en la comprensión de algunos hechos.

El objetivo de este trabajo es comunicar la observación de cuadros clínicos neurológico-metabólico secundarios a la ingestión de jugos de fruta semi-sintéticos que presentaban un elevado contenido amoniacal puede provocar cuadros neurológicos. Para poder asociar este cuadro a los jugos de fruta consumidos por los pacientes y que al analizarlos presentaron elevadas concentraciones de compuestos amoniacales, se comparó con el hecho que dietas con exceso de compuestos amoniacales correlativo al hallazgo de hiperamoniemia en la sangre de los pacientes, coincidiendo la normalización

del indicador con la mejoría clínica de los pacientes. Se conoce que dietas con exceso de compuestos amoniacales o precursores de amoniaco como la urea pueden producir toxicidad a nivel del sistema nervioso central en animales<sup>1-4</sup> y también que en seres humanos la absorción amplia de compuestos amoniacales puede producir hipertoniá y convulsiones.<sup>5</sup>

Cabe señalar que para calcular la proporción de jugo natural existente en cada marca comercial de jugo semi-sintético (mezcla de jugos naturales más diluyentes y compuestos sintéticos) se utiliza la medición de nitrógeno total, hecho que podría considerarse como hipótesis de probable adulteración.

### MATERIAL Y MÉTODO

Se analizan las Historias Clínicas de tres pacientes atendidos en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Sanatorio de Niños, Rosario, Argentina, en

(\*) Autor a quien dirigir la correspondencia

1994, con cuadros neurológicos e hiperamoniemia, resaltando los datos relevantes. También se utiliza como material las determinaciones bioquímicas realizadas a los jugos. Los pacientes estudiados se denominaron por números: 1, 2, y 3.

El método para el análisis de los jugos es el N° 28 (*Federation International Des Producteurs de Jus de Fruit*, Año 1965).<sup>6</sup> En el paciente # 1 se analiza el mismo jugo ingerido y en los otros pacientes se toman muestras del mismo lugar donde se compararon los jugos ingeridos.

## RESULTADOS

### Paciente #1

Paciente de 12 años de edad, eutrófico, que ingresó a UTI del Sanatorio de Niños de Rosario, el 18/10/94. Los familiares refirieron que en pleno estado de salud comenzó (una hora antes del ingreso), con un cuadro de alteración de la visión (primero manchas grises y luego pérdida de visión), cefaleas intensas y depresión sensorial. A su ingreso impresionó gravemente enfermo, con midriasis, desviación conjugada de la mirada hacia la derecha y nistagmus. No presentaba clonus ni signo de Babinski. A la hora del ingreso, con diagnósticos probables de hemorragia cerebral o intoxicación aguda, fue necesario colocarlo en asistencia mecánica respiratoria (AMR). Se le practicó una tomografía axial computada (TAC) de urgencia no observándose signos de sangrado ni desplazamiento de estructuras; sólo presentaba signo de edema cerebral difuso. El electroencefalograma (EEG) denotaba sufrimiento cortical difuso. Se enviaron muestras a laboratorio especializado para descartar metabolopatías. El laboratorio de rutina no mostraba particularidades. Los cultivos de sangre y de líquido cefalorraquídeo (LCR) fueron negativos. El análisis químico de LCR era normal. En el interrogatorio familiar se destacaba el antecedente de que el cuadro comenzó luego de la ingestión de jugo envasado en bidón, cuyo envase (Marca Comercial "A") recién había sido abierto. El paciente tomó 2 vasos de ese jugo muy concentrado y a los minutos apareció el cuadro clínico referido. Se investigó cianuro en el jugo con resultados negativos. El paciente presentó rápida mejoría, se le retiró la AMR y recuperó la lucidez. El único dato positivo de todos los estudios solicitados fue una amoniemia de 600 ug/dl al ingreso. Repetida la amoniemia a las 12 horas arrojó un resultado de 120 ug/dl.

### Paciente #2

Paciente de 13 años de edad, eutrófico, que ingresó a la UTI del Sanatorio de Niños de Rosario el día 6/11/94 con convulsiones sub intrantes y coma. Presentaba el antecedente de que una semana previa al ingreso había tenido fiebre y decaimiento que se interpretó como mononucleosis infecciosa (con "Monotest<sup>®</sup>" positivo). El paciente refirió intenso decaimiento 12 horas antes del ingre-

so, pico febril y presentó un episodio de rigidez con pérdida de la visión de 5 minutos de duración y posterior aparición de movimientos clónicos de miembros superiores e inferiores que cedieron con la administración de diacepán. El examen neurológico mostró leve rigidez de la nuca; el EEG sufrimiento cortical difuso; la TAC de cráneo fue normal. Los cultivos dieron resultados normales. La serología para herpes fue negativa. El análisis del LCR arrojó estos resultados: 20 elementos/mm<sup>3</sup>, Reacción de Pandy negativa, Proteínas: 0.45 g/l, Glucosa 0.95 g/l. Cultivo (-). La amoniemia al ingreso fue de 680 ug/dl y a las 24 horas de 46 ug/dl. Tenía el antecedente de haber consumido jugos en "sachet" (congelados) marca "B" un día antes del comienzo del cuadro. Evolucionó favorablemente en 48 horas habiendo recuperando el sensorio normal.

### Paciente #3

Paciente eutrófico de 13 años de edad que ingresó a la UTI del Sanatorio de Niños, el día 5/12/94, derivado por un servicio de emergencia con un cuadro de convulsiones. Refiere haber comenzado el día anterior con decaimiento y vómitos y por la noche se agregó fiebre. A la mañana del día de la internación sufrió pérdida del conocimiento y quedó rígido. Previamente presentó dificultad respiratoria y movimientos involuntarios, hipertonia generalizada y relajación de esfínteres. Se medicó con diacepán. Luego apareció excitación psicomotriz post-ictal, movimientos incoordinados, pupilas con midriasis y reactivas. Se realizó una TAC de cráneo de resultado normal y punción lumbar. El análisis del LCR reveló 3 elementos/mm<sup>3</sup> con predominio de linfocitos, concentración proteica de 1.40 g/l, Reacción de Pandy positiva, Glucosa 1,21 g/l. Se envió a bacteriología para realizar cultivo. La amoniemia al ingreso fue de 864 ug/dl. El resto de los resultados del laboratorio estuvieron dentro de límites normales. El EEG denotaba sufrimiento cortical difuso. Como antecedente estaba el de haber tomado un jugo en sachet, marca "B" la noche anterior al comienzo del cuadro. Evolucionó en forma favorable el día 6/12/94, mostrándose más reactivo y menos excitable. Se le dio de alta asintomático el 7/12/94, fecha en la que su amoniemia había descendido a 31 ug/dl.

## Resultados de análisis de jugo

Tabla I. Jugos de los pacientes presentados

Jugos	Paciente	N orgánico	Nitratos
Marca "A"	1	332 mg/dl	-
Marca "B"	2	339 mg/dl	170 ppm
Marca "B"	3	291 mg/dl	90 ppm

Tabla II. otros jugos tomados como testigo.

Jugos	N orgánico	N amoniacal
C: 1ra marca	12.9 mg/dl	4.5 mg/dl
D: 1ra marca	8.1 mg/dl	0.8 mg/dl
E: 2da marca	16.2 mg/dl	4.9 mg/dl

## DISCUSIÓN

Se presentan 3 pacientes adolescentes varones que cursan un cuadro neurológico agudo caracterizado por depresión del sensorio (en el primero de ellos muy marcada) y/o convulsiones. Los estudios complementarios neurológicos (EEG, TAC, estudio de LCR) presentan resultados normales o con pequeñas modificaciones que no justifican el cuadro clínico. Todos presentan estudios bacteriológicos y virológicos negativos. Los tres pacientes presentan cifras elevadas de amonio en sangre al ingreso que se normalizan en 24 horas.

Resulta destacable que en otros cinco pacientes adolescentes, atendidos previamente por nuestro equipo, con cuadros neurológicos similares se había encontrado el antecedente de la ingestión de jugos pero no se había relacionado este hecho con el cuadro clínico. El hallazgo de cifras elevadas de amonio en sangre en el paciente # 1 permite orientar la búsqueda hacia esa posibilidad.

El contenido de amonio en el cerebro de varias especies animales se mantiene constante, bajo condiciones normales. El amonio puede ser transportado desde la sangre al cerebro a través de la barrera hematoencefálica.<sup>7</sup> El hígado de los mamíferos es el órgano más importante para mantener bajos los niveles normales de amonio, mediante la formación de urea. En la intoxicación de origen exógeno por amonio tiende a incrementarse el ciclo hepático de la urea como un mecanismo de detoxificación,<sup>8</sup> pero este mecanismo puede ser superado por una ingestión excesiva o en dosis sucesivas provocando un incremento de la concentración sanguínea de amonio y posteriormente una mayor entrada al cerebro.<sup>9</sup>

El metabolito tóxico en la hiperamoniemia es el amonio, ya que este síndrome puede inducirse mediante infusión en animales de experimentación.<sup>10</sup> Como se mencionó en la introducción, se conoce que dietas con exceso de compuestos amoniacaes o precursores de amoníaco como la urea pueden producir toxicidad a nivel del sistema nervioso central en animales.<sup>14</sup> En seres humanos la absorción amplia de compuestos amoniacaes puede producir hipertensión y convulsiones.<sup>5</sup>

La hiperamoniemia puede deberse a causas endógenas ya que existen anomalías genéticas relacionadas con el ciclo de la urea que se manifiestan con elevación del amoníaco sanguíneo.<sup>11</sup>

También puede ser de causa hepática o, exógenas,<sup>12</sup> tales como una complicación de la nutrición parenteral total, especialmente en lactantes donde se manifiesta por letargia, sacudidas musculares y convulsiones generalizadas.<sup>13</sup> Se conoce que trabajadores expuestos crónicamente al amonio pueden presentar cefalea y somnolencia.<sup>14</sup> Otra causa exógena de hiperamoniemia referida es por utilización de glicina en irrigación de pacientes intervenidos por prostatectomía transuretral.<sup>15</sup> La infusión experimental en voluntarios humanos de acetato de amonio provocó flaccidez de los músculos faciales, temblores, malestar generalizado, fallas en

las actividad motora, etc.<sup>16</sup>

En la encefalopatía hepática el amoníaco se genera por medio de las bacterias productoras de ureasa a nivel del colon. Una falla hepática aguda, con alteración en la extracción o metabolismo hepático del amoníaco, determina acumulación de dicho metabolito en sangre, cerebro y LCR. Existen factores que pueden incrementar la producción de amoníaco.<sup>17</sup> En los pacientes analizados en esta presentación no se encontraron alteraciones hepáticas que justifiquen ese cuadro.

En los pacientes presentados no se descartaron esas anomalías pero se considera improbable como causa ya que, cuando no es de presentación neonatal, los cuadros de origen genéticos se caracterizan por presentar episodios recurrentes (no aislados) de hiperamoniemia. Se realizó el seguimiento de estos pacientes varios años sin repetir ninguno el cuadro neurológico. Por esta razón se retrasó la presentación y posterior publicación de este trabajo (fue presentado en el I Congreso Uruguayo de Toxicología Clínica, Montevideo, Uruguay, recién el 1 de abril de 2000).

La concentración de amonio encontrada normalmente en la sangre humana varía entre 80 y 110 microgramos/decilitro.<sup>18</sup> Se pueden encontrar incrementos de 4 o más veces los niveles normales en algunas hepatopatías debido a que la ureasa necesaria para convertir el amonio en urea sólo se encuentra en el hígado.<sup>19</sup> Se considera que los niveles sanguíneos de amonio no son indicadores muy precisos de exposición exógena al amonio. En experimentación se ha encontrado una correlación pobre entre los niveles sanguíneos (y eventualmente cerebrales) de amonio y la severidad de los síntomas observados.<sup>17</sup> A pesar de ello, resulta destacado que los valores de amonio en sangre en los pacientes presentados son varias veces superiores al nivel normal y que esas cifras se normalizan rápidamente, coincidentemente con la evolución clínica favorable.

Las tres muestras de jugos analizados presentaron valores elevados de nitrógeno orgánico:

- Marca A; 332 mg/dl

- Marca B: 339 y 291 mg/dl.

La recomendación mínima para jugos de citrus es de 16 mg/dl. El marbete del jugo A señala que debe diluirse 10 veces situación que aparentemente no sucedió en el paciente # 1. El jugo marca B se fraccionaba en envases de plástico tipo sachet, individuales lo que impidió buscar en los mismos utilizados por los pacientes (carecían también de número de partida). La elevada cantidad de nitrógeno orgánico no podía ser explicada en este caso por la falta de dilución ya que estaban listos para el consumo. Las cifras elevadas de nitrógeno y de nitratos encontrados en las muestras orienta a pensar en fallas en su preparación y/o adulteración. Se podría especular que por la forma de comercialización (congelados), si se pierde la cadena de frío se podría generar contaminación bacteriana. Para poder valorar los valores hallados de nitrógeno,

posteriormente se procesan muestras de otros jugos (de primera y segunda marca) con resultados cercanos a la recomendación mínima (16 mg/dl). En estos análisis además se pudo discriminar en nitrógeno orgánico y nitrógeno amoniacal, siendo los valores del nitrógeno amoniacal bajos. Creemos que a los jugos que ocasionaron los cuadros descriptos se les podría haber agregado alguna sal de amonio, probablemente porque en los análisis bromatológicos se utiliza al nitrógeno total para calcular el porcentaje de jugo natural del preparado.

## CONCLUSIONES

Los jugos de frutas con elevado contenido de compuestos nitrogenados fueron la causa de la hiperamoniemia en los pacientes presentados. Mediaron especiales circunstancias, tales como su consumo en forma concentrada, pero los mismos presentaban cantidades elevadas de nitrógeno orgánico. Se plantea la utilidad de la medición de amonio en sangre en pacientes neurológicos.

En Toxicología Clínica se debe estar alerta para interpretar cuadros nuevos debidos a usos inadecuados de sustancias como en este caso o a la aparición de síntomas no descriptos en la literatura.<sup>20</sup>

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lloyd WE. **Urea and other non-protein nitrogen sources.** In Howard JL (ed). *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice 2*, Saunders WB, Philadelphia, (1998) pp.354-356.
2. Osweiler GD, Carson TL, Buck WB et al: **clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology**, 3rd ed. Kendall/Hunt Publishing Co, Dubuque, IA.(1985).pp 27-39, 160-166.
3. Robinson NE (Ed):**Current Veterinary Therapy in Equine Medicine.** 2 Saunders WB (1987). Philadelphia,PA.
4. Rumbelha WK & Oehme FW. **General and Applied Toxicology**, Vol. 2 B. Ballantyne T, Marrs & Turner P, eds. Stockton Press, New York, (1993) pp 1287.
5. HSDB: **Hazardous Substances Data Bank.** National Library of Medicine. Bethesda, MD. (CD-Rom Version), (1992) Micromedex, Inc, Englewood, CO.
6. **Métodos oficiales de análisis de los alimentos.** AMV Ediciones Mundi Prensa. (1994) Pág.341
7. Kvamme E. **Ammonia metabolism in the CNS.**( 1983) *Progress in Neurobiology*, 20. Pp 109-132.
8. Seiler N. **Is Ammonia a Pathogenetic Factor in Alzheimer's Disease?**. *Neurochemical research*, (1993) 18:235-245.
9. Evangelista de Duffard AM, Bortolozzi A, Olguín MC, García G, Marinozzi D, Vignale ME, Madariaga MJ, Duffard R. **Intoxication by non-protein nitrogen compounds in rat feed.** *Drug and Chemical Toxicology*, (1999) 22(2), 421-433.
10. Lloyd HS. **Enfermedades del ciclo de la urea.** En Wyngaarden JB, Lloyd HS, Bennet JC (Editores). *Cecil: Tratado de Medicina Interna.* 19 edición. (1992). Vol 1. Pág, 1285-1286
11. Brusilow SW, Horwich AL: **Urea cycle enzymes.** In Scriver CR, Beaudet A, Sly W et al (eds): *The metabolic Basis of Inherited Disease.* 8th Ed. New York. Mc Graw-Hill. (1989).pp629-663.
12. Kirk RW (Ed): **current Veterinary Therapy IX.** Saunders. Philadelphia,PA, (1986)
13. **El Manual Merck de diagnóstico y tratamiento.** Décima edición española. Edición del Centenario. Hartcourt.(1999).Pág.20
14. Anderson J, Berenger J, Castela R. **Detection of chronic ammonia poisoning in joint plant medical services.** *Rev Med Travail*(1976).4:293-300.
15. Shepard RL, Kraus SE, Babayan RK, Siroky MB. **The role of ammonia toxicity in the post transurethral prostatectomy syndrome.** *Br J Urol* (1987); 60:349-351.
16. Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC: **Clinical Toxicology of Commercial Products**, 5th ed. Williams & Wilkins. (1984).pp. III21-III26.
17. Balcells A. **La clínica y el laboratorio.** Ediciones Científicas y Técnicas SA.16 ed.(1996).Pag.60-70
18. Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG. **Principles of Internal Medicine.** 11th ed. McGraw-Hill. New York, NY.(1987).
19. Smith BP: **Large Animal Internal Medicine.** (1990) The CV Mosby Company, Philadelphia, PA.
20. Piola JC, Prada DB, Ezpeleta DC. **Rabdomiólisis aguda por exposición percutánea a un herbicida en dos pacientes atendidos en Rosario, Argentina.** *Acta Toxicol. Argent.* (1999) 7(1):11-15.

## CAPTACION DE CADMIO POR BIOMASA LIBRE O INMOVILIZADA DE *Nostoc minutum* (CIANOBACTERIA FILAMENTOSA)

Susana G. Ferrari, Gabriela C. Guzmán, Patricia G. Silva, Lucía E. Alcaráz, Humberto J. Silva y Diana M. González<sup>1</sup>(\*)

Laboratorio de Alimentos -Área Microbiología. <sup>1</sup> Toxicología y Química Legal. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. 5700. San Luis.  
TE: 02652 423789 interno 112. e-mail: dgonza@unsl.edu.ar

**RESUMEN.** Ferrari, S.G.; Guzmán, G.C.; Silva, P.G.; Alcaráz, L.E.; Silva H.J. y González.D.M. **Captación de cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (cianobacteria filamentosa).** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1):19-22.* Los riesgos ambientales por contaminación con metales pesados han aumentado en los últimos tiempos. La cianobacteria *N. minutum* fue utilizada para la remoción biológica de cadmio de soluciones acuosas.

La biomasa no viable adsorbió Cd rápidamente de las soluciones de 10, 20 y 50 mg/l. El pretratamiento de las células con NaOH 0,1 N incrementó los niveles de adsorción de Cd en todas las condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos con biomasa inmovilizada en perlas de alginato mostraron valores superiores en la remoción de Cd ( 53% ) comparado con las células en suspensión.

**ABSTRACT.** Ferrari, S.G.; Guzmán, G.C.; Silva, P.G.; Alcaráz, L.E.; Silva H.J. y González.D.M. **Cadmium biosorption by free and immobilized *Nostoc minutum*.** *Acta Toxicol. Argent. (2004) 12 (1): 19-22.* Against a background of the increasing environmental risks caused by heavy metals, the cyanobacterium *N. minutum* was taken as an example for research of biological removal of Cd from aqueous solutions. Non-viable biomass was able to eliminate cadmium (10, 20 y 50 mg/l) in a short time by biosorption in uncomplicated systems. Pretreatment of cells with 0.1N NaOH increased the level of its Cd adsorption in all conditions assayed. Immobilized biomass as alginate beads was suitable for the Cd removal under batch conditions, exhibited a higher level (53%) in comparison with that by free cells.

**Palabras clave:** *Nostoc minutum*, bioadsorción, cadmio, inmovilización en alginato.

**Key words:** *Nostoc minutum*, biosorption, cadmium, alginate immobilization.

### INTRODUCCIÓN

La contaminación de aguas superficiales o subterráneas con metales pesados es un serio problema ambiental que surge como consecuencia de una descarga indiscriminada de efluentes industriales, agrícolas y/o domésticos en ecosistemas acuáticos.<sup>1,2</sup> La deposición acelerada puede provocar que los mismos estén presentes en la cadena alimenticia, pudiendo ser nocivos para la salud humana.<sup>3</sup> Debido a la baja eficiencia y alto costo de los métodos convencionales para la remoción de los metales (electrodialisis, precipitación, absorción o intercambio iónico) han sido propuestos procesos de bioremovoción para soluciones diluídas del orden de 1-100 mg/l de metal disuelto.<sup>4,5</sup>

La acumulación metálica en los microorganismos puede deberse a sistemas de absorción dependiente del metabolismo o a sistemas de adsorción sobre la superficie de paredes celulares o envolturas externas, siendo este último proceso una reacción rápida y reversible no mediada por procesos metabólicos. En los procesos de adsorción las células muertas pueden acumular la misma o una mayor proporción de contaminantes que las células vivas.<sup>4</sup> Numerosos microorganismos incluyendo a bacterias, levaduras y algas han sido estudiados como posibles materiales biosorbentes.<sup>6, 7, 8, 9, 10</sup>

Las cianobacterias poseen la capacidad de bioadsorber y bioacumular metales pesados.<sup>11, 12</sup> Fueron utilizadas en la recuperación de cadmio desde ambientes acuáticos con reducción de las concentraciones a 100 ppb<sup>3</sup> y además pueden producir sustancias con propiedades biofloculantes para la sedimentación de metales disueltos en agua.<sup>13</sup> Este estudio analiza la adsorción de Cd por biomasa no viable de una cianobacteria filamentosa fija-

dora de nitrógeno, *Nostoc minutum*, aislada en la provincia de San Luis. Las propiedades bioadsorptivas fueron estudiadas mediante el empleo de diferentes pretratamientos físico-químicos. Además, fue analizado el efecto de los iones Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> presentes en aguas duras y la inmovilización de la biomasa en perlas de alginato de calcio.

### MATERIALES Y METODOS

#### Microorganismo y condiciones de cultivo

Los cultivos unialgales de *Nostoc minutum*, cianobacteria filamentosa aislada localmente en la provincia de San Luis (Argentina), fueron obtenidos en columnas de vidrio de 2 litros, conteniendo 1.800 ml de medio BW<sub>3</sub>,<sup>14</sup> con y sin agregado de NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno, y agitados por la inyección de aire comprimido estéril a un flujo de 0,6 l/min. Los cultivos fueron iluminados continuamente con un panel de tubos fluorescentes a una intensidad de 26 W/m<sup>2</sup> e incubados por dos semanas en cámara estufa a 30°C. La biomasa fue cosechada por centrifugación a 3.000 rpm a 4°C, lavada con agua destilada estéril y secada en estufa a 37°C.

#### Pretratamientos de la biomasa cianobacteriana

La biomasa seca de *N. minutum* fue sometida a tres pretratamientos: a) tratamiento alcalino: NaOH 0,1N (10 ml/50 mg de biomasa) en estufa a 37°C durante 10 minutos, seguido de lavado de la biomasa con agua destilada estéril y centrifugación a 3.000 rpm por 10 minutos, b) autoclave a 121°C durante 20 minutos. La biomasa pretratada según a) y b) fue secada a 37°C hasta peso constante y c) calentamiento a 80°C durante 1 hora. Todos los ensayos fueron realizados con biomasa reducida a finas partículas de polvo.

(\*) Autor a quien dirigir la correspondencia

### Inmovilización de la biomasa cianobacteriana en alginato

La biomasa de *N. minutum* sin tratamiento o tratada con álcali fue resuspendida en una solución de alginato de sodio (Sigma) al 3% (p/v), con una proporción de biomasa: alginato de 0,064:0,1 (p/p) de acuerdo a lo descrito por Pradham and Rai.<sup>1</sup> La mezcla fue introducida en una jeringa y vertida por goteo a una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M formando partículas de 3 mm de diámetro. Las perlas fueron mantenidas una noche en la solución de CaCl<sub>2</sub> para mejorar su estabilidad mecánica. Los ensayos de bioadsorción se efectuaron utilizando 3,5 g de perlas de alginato conteniendo 50 mg de biomasa.

### Determinaciones de cadmio

Soluciones de distintas concentraciones de cadmio fueron preparadas (10, 20 y 50 mg/l) disolviendo Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en agua destilada. Para las experiencias de bioadsorción, 50 mg de biomasa fueron suspendidos en 50 ml de las distintas soluciones de Cd con agitación magnética.

Las determinaciones de Cd<sup>2+</sup> libre fueron realizadas a distintos intervalos de tiempo durante 60 minutos con un electrodo ión selectivo Orion modelo 9648, cuyo límite de detección es 0,01 mg/l. Además, fue analizada la bioadsorción en soluciones de 20 mg/l de Cd<sup>2+</sup>, con adición de 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O y 2,06 mM de MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O.

Con el objetivo de hallar las diferencias significativas en la bioadsorción de Cd con biomasa libre o inmovilizada, o en presencia de los iones Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> se realizó un análisis de la varianza de una vía y posterior comparación por Tukey, para un grado de significación del 95 %. Estas pruebas se realizaron con el empleo del programa estadísticos Stat sobre MS Dos.

### RESULTADOS

*N. minutum* obtenido de cultivos fotoautotróficos con o sin adición de fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>) mostró una eficiencia marcadamente diferente en la capacidad bioabsortiva de Cd con un rendimiento superior al 78 % cuando se empleó biomasa obtenida con NaNO<sub>3</sub>. Los resultados de las pruebas de bioadsorción de Cd muestran que el proceso de captación ocurre rápidamente alcanzando valores máximos estables entre los 30 y 60 min posteriores al contacto con la solución de Cd (Figura 1).

Al emplear biomasa en suspensión, pretratada o sin tratamientos, en soluciones de 10 y 20 mg/l de Cd se logran porcentajes elevados de remoción (Figura 2). Este comportamiento con biomasa no tratada disminuye notoriamente al aumentar la concentración de Cd a 50 mg/l; sin embargo, el análisis de la capacidad bioadsortiva específica mediante el coeficiente q (mg de Cd adsorbido por unidad de peso seco) muestra un incremento de esta propiedad con el aumento de la concentración inicial de Cd (Tabla 1).

La capacidad de remover metales pesados resultó ser diferente de acuerdo a los pretratamientos efectuados. La biomasa residual luego del tratamiento en

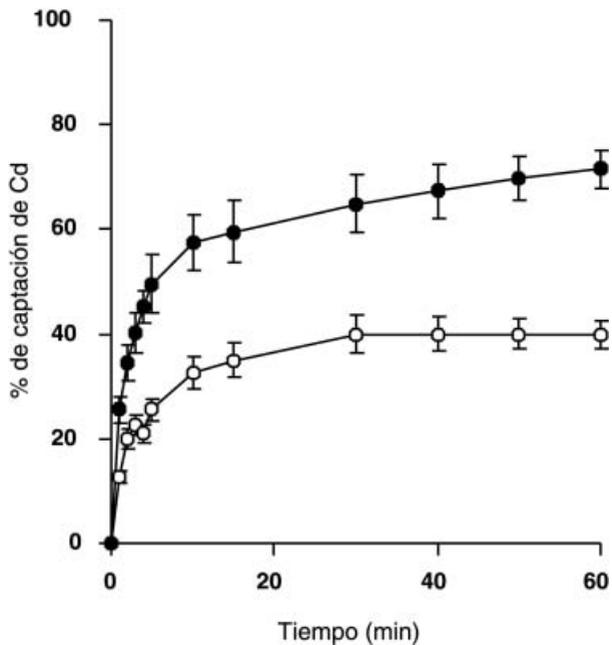


Figura 1. Efecto de la fuente de nitrógeno en cultivos fotoautotróficos de *N. minutum* sobre el porcentaje de bioadsorción de cadmio (20 mg/l) por biomasa en suspensión homogénea, (●) NaNO<sub>3</sub> y (○) sin fuente de nitrógeno.

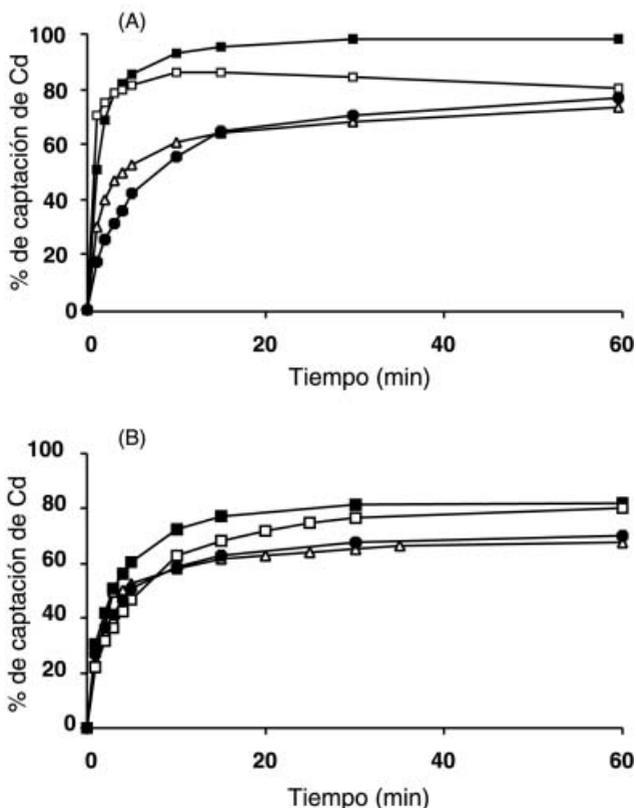


Figura 2. Bioadsorción de Cd (%) por biomasa de *N. minutum* en suspensión homogénea con o sin pretratamientos para dos diferentes concentraciones iniciales: A) 10 mg/l y B) 20 mg/l (●) biomasa libre sin pretratamiento, (Δ) secada a 80°C, (□) autoclavada a 121°C y (■) tratada con NaOH, 0,1 N.

**Tabla 1.** Efecto de la concentración de Cd sobre la capacidad de bioadsorción de biomasa de *N. minutum* sin tratamiento en suspensión homogénea.

Cd (mg/l)	Bioadsorción de Cd (%)	q (mg/g) <sup>a</sup>
10	76,81	7,68
20	70,47	14,09
50	34,00	17,00

a  $q = (C_i - C_f) \cdot V / B$ , siendo  $C_i$  y  $C_f$  la concentración inicial y final de Cd en solución; V es el volumen de la solución y B la biomasa de *N. minutum* expresada en g.

autoclave presentó una capacidad de captación superior a la obtenida usando biomasa sin tratar en un 4,8% y 14,2 % para concentraciones de 10 y 20 mg/l de Cd, respectivamente. En cambio, con biomasa secada a 80°C disminuyó la captación natural. De todos los pretratamientos efectuados, el tratamiento con NaOH 0,1 N a 37°C resultó ser el más efectivo en la bioadsorción de cadmio (Figura 2).

La disminución observada en la bioremovoción de Cd en presencia de los iones  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  en concentraciones similares a las encontradas en aguas duras no presentó diferencias significativas cuando se efectuó el análisis de varianza de una vía. Sin embargo, la biomasa de *N. minutum* tratada con NaOH presentó una disminución en la biocaptación de cadmio con una diferencia significativa ( $p=0,02$ ) sólo en presencia de los iones  $Mg^{+2}$  (Tabla 2). Al aumentar la concentración de Cd a 50 mg/l se observó un mayor porcentaje de captación por la biomasa inmovilizada en perlas de alginato en relación a

**Tabla 2.** Influencia de los iones  $Ca^{2+}$  (2,5 mM) y  $Mg^{2+}$  (2,06 mM) en la bioadsorción de Cd (20 mg/l) por biomasa de *N. minutum*.

Tratamiento	Bioadsorción de cadmio (%)		
	Sin iones	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$
Sin tratamiento	71,19 ± 8,75	51,00 ± 0,30	56,10 ± 2,45
NaOH 0,1 N a 37°C	81,08 ± 1,94	72,00 ± 3,50	65,65 ± 0,93

Los valores son los valores medios de dos experiencias individuales ± la desviación estándar.

**Tabla 3.** Bioadsorción de Cd (%) por biomasa de *N. minutum* en suspensión homogénea e inmovilizada en perlas de alginato de calcio.

Tratamiento	Bioadsorción de cadmio (%) <sup>*</sup>		
	Biomasa libre	Biomasa inmovilizada	Incremento relativo (%) <sup>†</sup>
Sin tratamiento	34,00 ± 1,50	52,00 ± 3,00	52,94
NaOH 0,1N a 37°C	47,44 ± 3,20	57,00 ± 4,20	20,15

<sup>\*</sup> Solución de Cd 50 mg/l.

<sup>†</sup> El incremento relativo fue calculado a partir de los valores medios de las experiencias.

la biomasa libre, con una significancia de  $p=0,03$  (Tabla 3). Este comportamiento fue observado en *Chlorella vulgaris* de acuerdo a lo descrito por Tam, et. al.<sup>15</sup> El pretratamiento con NaOH 0,1 N incrementó la capacidad de bioadsorción tanto en biomasa en suspensión homogénea como en biomasa inmovilizada. Sin embargo, con este pretratamiento el aumento relativo en la bioadsorción de Cd al inmovilizar las células en perlas de alginato no presentó diferencias significativas (Tabla 3).

## DISCUSION

La remoción de Cd por biomasa no viable dependió de las condiciones de obtención de la misma, presentando mayor capacidad adsorptiva al utilizar  $NaNO_3$  en el crecimiento fotoautotrófico de *N. minutum*.

La habilidad de las cianobacterias de bioacumular iones metálicos en su pared celular está determinada principalmente por mecanismos de intercambio iónico, en los cuales intervienen grupos carboxilos de aminoácidos y polisacáridos, grupos sulfidrilos y pectinas no metiladas; y también por uniones covalentes.<sup>16</sup>

Sin embargo, no se conocen los factores que intervienen en la variación de esta capacidad bioacumulativa cuando se modifican las condiciones nutricionales del medio de cultivo. En las experiencias realizadas por Tease and Walker con *Gloeothece* ATCC 27152 desarrollada con y sin  $NaNO_3$  también se encontró una mayor captación en la primera condición.<sup>17</sup>

Determinadas cepas de cianobacterias son capaces de producir potentes neurotoxinas y hepatotoxinas.<sup>18</sup> El empleo de biomasa no viable de cianobacterias presenta la ventaja de eliminar la posible acción de agentes tóxicos inherentes a ellas. Otras ventajas son la independencia del suministro de nutrientes y la ausencia de inconvenientes de contaminación o de inactivación por los iones metálicos.<sup>11</sup> En experiencias realizadas por Tam et. al. con la microalga verde *Chlorella* se obtuvieron mejores rendimientos cuando se empleó biomasa no viable comparada a controles con células vivas,<sup>19</sup> atribuyéndose la mejora a la posibilidad de utilizar concentraciones del metal superiores a las tóxicas para las células vivas.

La biomasa de *N. minutum* pretratada con calor a 80°C presentó la menor captación de cadmio debido posiblemente a la destrucción de los sitios de unión al metal por acción del calor. Sin embargo, esta condición puede ser útil considerando que la biomasa de *N. minutum* podría ser un residuo utilizable luego de un tratamiento de extracción en caliente en la preparación de extractos cianobacterianos con actividad biológica.<sup>20,21</sup> Contrariamente, con biomasa de *Chlorella* pretratada con calor en autoclave o secada en horno a 80°C se observó una buena respuesta en la remoción de Cu con respecto a la biomasa viva.<sup>19</sup>

El tratamiento de *N. minutum* con NaOH permitió aumentar la capacidad de remoción de Cd. Básica-

mente, ocurriría por la ruptura de la pared celular con exposición adicional de grupos funcionales de naturaleza aniónica que incrementan el número de sitios de unión para Cd. Además, existiría una desprotonación de los sitios de unión con el reemplazo de iones sodio, los cuales son finalmente reemplazados por Cd.<sup>22, 23</sup> En aguas duras fueron descriptos comportamientos disímiles en la remoción de iones metálicos con biomasa de cianobacterias tratadas con álcali, mostrando una disminución en la adsorción de Cd en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>,<sup>3</sup> comportamiento que también presentó *N. minutum* en presencia de los iones Mg<sup>2+</sup> (Tabla 2).

*N. minutum* conservó su capacidad de remover Cd en presencia de estos iones, mostrando una selectividad en la bioadsorción en aguas duras, habilidad que se mantuvo cuando la biomasa fue tratada con NaOH en presencia de iones Ca<sup>2+</sup>.

La utilización de biomasa inmovilizada presenta ventajas frente a la biomasa en suspensión tales como: fácil regeneración y posterior reutilización de la biomasa, fácil separación de las células del efluente, simple manejo operacional y escalado directo desde las experiencias de laboratorio<sup>24</sup>.

La biomasa de *N. minutum* inmovilizada en perlas de alginato removió significativamente más Cd que las células en suspensión homogénea. Sin embargo, se observó que la inmovilización de biomasa pretratada con álcali afectó su eficiencia adsorptiva, no existiendo diferencias significativas en la remoción de Cd con ambas biomásas inmovilizadas. Este resultado podría deberse a que, si bien se produce la activación de un mayor número de sitios activos por el pretratamiento con álcali, los mismos se estarían perdiendo con la inmovilización, conduciendo a una reactividad más reducida y uniones más débiles con el catión.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Lic. Isabel Gimenez por sus sugerencias en el análisis estadístico de los datos. Este trabajo fue subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis.

### BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Pradhan, S. and Rai, L.C. (2000). **Optimization of flow rate, initial metal ion concentration and biomass density for maximum removal of Cu<sup>2+</sup> by immobilized *Microcystis***. World J. Microbiol. Biotechnol. 16, 579-584.
2. Conti, M.E., Facchini, M. y Botrá, F. (2000). **Indicadores biológicos para la evaluación de metales pesados en un ecosistema marino del Mediterráneo**. Acta Toxicol. Argent. 8 (2), 65- 68.
3. Nagase, H., Inthorn, D., Isaji, Y., Oda, A., Hirata, K. and Miyamoto, K. (1997). **Selective cadmium removal from hard water using NaOH-treated cells of the cyanobacterium *Tolypothrix tenuis***. J. Ferment. Bioeng. 84 (2), 151-154.
4. Volesky, B. (1990). **Biosorption of Heavy Metals**. CRC Press, Boston, USA. 408 pp.
5. Sampedro, M.A., Blanco, A., Llama, M.J. and Serra, J.L. (1995). **Sorption of heavy metals to *Phormidium laminosum* biomass**. Biotechnol. Appl. Biochem. 22, 355-366.
6. Wilde, E.W. and Benemann, J.R. (1993). **Bioremoval of**

- heavy metals by the use of microalgae**. Biotech. Adv. 11, 781-812.
7. Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. and Clark, D.S. (1997). **Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture**. Appl. Environ. Microbiol. 63 (10), 4075-4078.
8. Chang, J.S., Huang, J.C., Chang, C.C. and Tarn, T.J. (1998). **Removal and recovery of lead fixed-bed biosorption with immobilized bacterial biomass**. Wat. Sci. Tech. 38 (4-5), 171-178.
9. Stoll, A. and Duncan, J.R. (1997). **Comparison of the heavy metal sorptive properties of three types of immobilized non-viable *Saccharomyces cerevisiae* biomass**. Process Biochem. 32 (6), 467-472.
10. Sala Cossich, E., Granhen Tavares, C.R., Ravagnani, T.M.K. (2002). **Biosorption of chromium (III) by *Sargassum* sp. biomass**. Electronic J. Biotechnol. 5 (2), 133-140.
11. Sandau, E., Sandau, P. and Pulz, O. (1996). **Heavy metal sorption by microalgae**. Acta Biotechnol. 16 (4), 227-235.
12. Fiore, M.F., Moon, D.H. and Trevors, J.T. (1998). **Metal Resistance and Accumulation in Cyanobacteria**. En: Wastewater Treatment with Algae, (Wong, Y.-S. and Tam, N.F.Y., eds), pp. 111-124, Springer, USA.
13. Bender, J., Rodriguez-Eaton, S., Ekanemesang, U.M. and Phillips, P. (1994). **Characterization of metal-binding bioflocculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats**. Appl. Environ. Microbiol. 60 (7), 2311-2315.
14. Silva, H.J., Italiano, M.C. and Ferrari, S.G. (1994). **Improved biomass production of cyanobacteria by re-utilization of the culture medium**. Biotechnol. Tech. 8(12), 889-894.
15. Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Simpson, C.G. (1998). **Repeated removal of copper by alginate beads and enhancement by microalgae**. Biotechnol. Tech. 12 (3), 187-190.
16. Prasad, B.B. and Pandey, U.C. (2000). **Separation and preconcentration of copper and cadmium ions from multi-elemental solutions using *Nostoc muscorum*-based biosorbents**. World J. Microbiol. Biotechnol. 16, 819-827.
17. Tease, B.E. and Walker, R. (1987). **Comparative composition of the sheath of the cyanobacterium *Gloeotheca* ATCC 27152 cultured with and without combined nitrogen**. J. Gen. Microbiol. 133, 3331-3339.
18. González, D.M., Echenique, R.O. y Silva, H.J. (2001). **Toxicidad y producción de metabolitos volátiles en *Cyanophyta* o algas verde-azuladas**. Acta Toxicol. Argent. 9 (2), 68-81.
19. Tam, N.F.Y., Wong, Y.-S. and Simpson, C.G. (1998). **Removal of copper by free and immobilized microalga, *Chlorella vulgaris***. En: Wastewater Treatment with Algae, (Wong, Y.-S. and Tam, N.F.Y., eds) Springer, USA. pp 17-36.
20. Silva, P.G., González, D.M., Aguilar, E.G. and Silva, H.J. (1998). **Nutritional evaluation of cyanobacterium (*Nostoc* sp.) extract in *Rhizobium* cultures**. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 223-228.
21. Vega, A.E., Cortiñas, T.I., Mattana, C.M., Silva, H.J. and Puig de Centorbi, O. (2003). **Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with cyanobacterial extract**. J. Clin. Microbiol. 41, 5384-5388.
22. Inthorn, D., Nagase, H., Isaji, Y., Hirata, K. and Miyamoto, K. (1996). **Removal of cadmium from aqueous solution by filamentous cyanobacterium *Tolypothrix tenuis***. J. Ferment. Bioeng. 82, 580-584.
23. Brierley, C. (1990). **Bioremediation of metal-containing surface and groundwaters**. Geomicrobiol. J. 8, 201-223.
24. Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995). **Biosorption of heavy metals**. Biotechnol. Progr. 11, 235-250.
24. Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995). **Biosorption of heavy metals**. Biotechnol. Progr. 11, 235-250.

**INDICES - INDEXES / VOLUMEN 11 (2003)****AUTORES - AUTHORS**

ABBRUZZESE, D. ....59	GIMENEZ, I. ....3
CID, J. ....3	GONZALEZ, D. ....3
FERRUA, N. ....3	SANSONE, G. ....3
FONOVICH DE SCHROEDER, T.M. ....59	

**INDICE TEMATICO - SUBJECTS INDEX**

Arsénico, en aguas subterráneas.....3	Arsenic in ground water.....3
Colorantes alimentarios, incorporación en la fracción lipídica.....59	XIII Argentine Toxicology Meeting. Abstracts.....64
XIII Congreso Argentino de Toxicología.	XXII Interdisciplinary Meeting of Toxicology.....7
XXIII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología	Editorial.....1, 57
II Jornadas Rioplatenses de Toxicología.	Food dyes, in lipid fraction.....59
Resúmenes.....64	Indigotin.....59
Editorial.....1, 57	Obituary.....49
Indigotina .....59	
XXII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología.	
Resúmenes. ....7	
Obituario .....49	

**INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES**

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Tiene por objetivo básico la publicación de trabajos originales, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, temas de divulgación, comentarios bibliográficos, notas técnicas y cartas al editor. Asimismo, se publicarán noticias relacionadas con los diferentes campos de la Toxicología.

Acta Toxicológica Argentina (en adelante "Acta") publicará contribuciones en español, portugués e inglés. Todas serán evaluadas por dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo del Comité Editorial. Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. En todos los casos los autores recibirán copia sin firma de la opinión de los evaluadores.

Las contribuciones científicas originales enviadas a consideración de ATA deberán ajustarse al siguiente formato básico:

- Página 1: título, subtítulo, nombres completos del o de los autores, laboratorio o institución donde se realizó el trabajo, dirección postal completa, incluyendo código postal, correo electrónico, teléfono y fax, autor al cual debe dirigirse toda la correspondencia.
- Página 2: título del trabajo en castellano e inglés y resúmenes de hasta 250 palabras en castellano e inglés. Tres - cuatro palabras clave en castellano, portugués e inglés.
- Página 3 en adelante: Introducción, Material y

Métodos, Resultados, Discusión, Bibliografía citada, Leyendas de Ilustraciones y Tablas con leyenda.

La extensión máxima de estos aportes no deberá superar las 8 (ocho) páginas. El texto deberá ser escrito en PC, en papel tamaño A4, a doble espacio, con márgenes superior, inferior e izquierdo de 4 cm. Se deberán enviar 3 juegos. Conjuntamente con las 3 copias del manuscrito, los autores deberán remitir una versión en disquete de 3 1/2 pulgadas utilizando alguno de los siguientes procesadores de texto: Word for MS-DOS; Word for Macintosh; Word Perfect for DOS, indicando programa y versión usados. En el caso que los revisores recomienden la revisión del trabajo, la nueva versión deberá enviarse en disquete y tres copias impresas consignando "versión 1".

Las comunicaciones breves deberán respetar un formato similar al indicado para las contribuciones científicas exceptuando el resumen en español.

El texto no necesariamente se dividirá en las partes indicadas (Introducción, Material y Métodos, etc.); no obstante deberá contener en forma concisa la información que corresponde a esas partes. La extensión de esta categoría de aportes no deberá superar las 3 (tres) páginas.

Las revisiones, actualizaciones y temas de divulgación deberán ser lo más concisas posibles y su extensión no excederá de 6 (seis) páginas. Su redacción deberá considerar lectores con formación científica pero ajenos o alejados del tema. Se considerarán preferentemente las revisiones solicitadas por el Comité Editorial.

Los comentarios bibliográficos serán contribuciones solicitadas por el Director. El autor deberá emitir una opinión fundamentada del trabajo sometido a su consideración. Además deberá incluir la siguiente información: título en idioma original, autor/es, edición considerada, traductor, editorial y sede de la misma, tomo o volumen, número de páginas y año de edición. Se indicará claramente nombre del comentarista, institución a la que pertenece y domicilio completo. El texto no podrá ocupar más de 2 (dos) páginas.

Las notas técnicas se referirán exclusivamente a modificaciones de métodos, determinación de errores de las mismas, etc. Su extensión no superará las 2 (dos) páginas; al final deberán constar los datos que identifiquen claramente al autor/es. Las cartas al Editor serán textos de una extensión no mayor de doscientas palabras y revestirán el carácter de correspondencia científica referida a textos publicados con anterioridad. El o los autores serán debidamente indicados.

Se solicita a los autores que tengan en cuenta las siguientes normas al preparar sus manuscritos:

- En todos los casos se deberá consignar en el ángulo superior derecho de cada hoja el apellido del autor o del primer autor y el número correlativo que corresponda, incluidas las páginas con Tablas.
- En el caso de sustancias químicas se tomará como referencia prioritaria a las normas de la IUPAC.
- Los organismos se denominarán conforme a las normas internacionales, indicando sin abreviaturas el género y la especie en *itálicas* o subrayados.
- Las ilustraciones (fotografías, gráficos) deben ser confeccionadas sobre materiales de alta calidad, con técnicas que permitan su reproducción sin tratamientos especiales. Es aconsejable que este material tenga las dimensiones de la caja de Acta; los autores deben tener presente que en los casos de ilustraciones en las que sea necesario proceder a su reducción, el tamaño de las letras, números y demás elementos de las mismas deben tener dimensiones mayores para que la nitidez no se vea afectada luego de la impresión. Se enviarán un juego de originales y dos copias. Cada una de las ilustraciones deberá portar en el dorso, escrito con lápiz suave, el número que le corresponde, nombre del primer autor y mediante una flecha se indicará la posición superior. Las

leyendas irán en hoja aparte. Los costos adicionales que pudieran ocasionarse por la edición de dicho material serán a cargo del autor.

- Las tablas y sus leyendas se presentarán en forma individual, en hoja aparte, identificadas mediante numeración arábiga conforme al orden en que aparecen en el texto.

La ubicación preferente de la tabla en el texto se indicará mediante una flecha. Las tablas se ubicarán al final de cada manuscrito.

- Las citas bibliográficas en el texto se indicarán mediante números correlativos, por orden de aparición, entre paréntesis; por ejemplo: "la separación de las isoenzimas se hizo por electroforesis de acuerdo a la técnica de Dietz y Lubtano (4)" En el caso de citar artículos de más de dos autores, se indicará el apellido del primero seguido de la expresión *et al.*: "Castañe *et al.* (5) fueron los primeros en..."

Las referencias bibliográficas serán agrupadas bajo el acápito "Bibliografía citada"; la lista se ordenará conforme a los números asignados.

El formato de las citas es el siguiente:

Artículo en publicación periódica: "Malla Reddy, P. and M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and cypemmerhrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochim. Hydrobio. 17 (1), 101-107"

Libro: "Dix, H.M. (1981), Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."

Las abreviaturas de la denominación de la revista serán las que ellas mismas indican en su texto.

- Cualquier modificación excepcional de las normas estipuladas que los autores soliciten será considerada por el Director.
- Las pruebas de galera se enviarán al autor indicado como receptor de la correspondencia. Las mismas serán revisadas y devueltas dentro de las 48 horas de recibidas.

- El autor indicado recibirá 10 separatas sin cargo. El excedente solicitado sobre esa cantidad será costado por el/los autores: la cantidad solicitada deberá ser indicada al Editor en el momento de devolver las pruebas de galera.

Toda la correspondencia referida a "Acta Toxicológica Argentina" deberá ser dirigida al Comité Editorial, Alsina 1441 (1088) Buenos Aires, Argentina Telefax ++54-11-4381-6919.

Se solicita canje con otras publicaciones temáticamente afines a Acta Toxicológica Argentina.

## INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) is the official journal of the Asociación Toxicológica Argentina (Argentine Toxicological Association) for scientific diffusion. Acta Toxicológica Argentina (herein below "Acta") is basically aimed at publishing original full-length papers, short communications, reports on

research in progress or review papers, topics of interest to workers in Toxicology, book reviews, technical communications as well as letters to the Editor. News relevant to the different fields of Toxicology will also be published.

ATA will publish articles written in either Spanish, Portuguese or English. Every article will be evaluated

by two examiners. Only the Editorial Board will be responsible for selecting articles with –that is, decisions about (a) rejected articles, (b) accepted articles with, however, changes to be introduced by authors, or (c) accepted articles with no changes whatsoever are a privilege of the Editor Board. In all cases, authors will receive an unsigned copy of the examiners' evaluation. Scientific original manuscripts submitted to the consideration of the Editorial Board should adhere to the following basic format:

- Page 1: Title, and subtitle of paper. Author's full names; academic or professional affiliation, and complete name of the laboratory or institution where research was done.

Complete address (city, State or Province, zip code, country, e-mail, phone number and fax number).

- Page 2: Title of paper in Spanish and English. A list of three or four key words in Spanish or Portuguese and English should be included.

- Page 3 onward: As a rule, full length papers should be divided into sections headed by a caption: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, caption of figures and caption of tables.

Full-length papers should not exceed eight pages.

Text should be typed with PC, on A4 paper, in double-spaced typing with at least 4 cm upper lower, and left margin. Typescripts should be submitted in triplicate. Besides the 3 copies of the manuscript, authors are requested to submit the paper on diskette (3 1/2") made in one of the next word processing systems: Word for MS-DOS; Word for MACINTOSH; Word Perfect for DOS indicating the program and version used. Revised versions of the paper, because of referee's recommendations should always be accompanied by a new diskette and 3 printouts of the manuscript. Short communications should adhere to a similar format. However it should contain no section headings, but text is supposed to contain, in a concise way, every information relevant to the above mentioned headings (Introduction, Materials and Methods, etc.). Short communications should not exceed three pages.

Review papers, updating, and reports on research in progress should be as concise as can be. Such articles should not exceed three pages. Their wording should address a scientifically educated reader-ship that, however, can be unfamiliar with topics involved. Review papers, updating, and reports on research in progress previously requested to authors by the Editorial Board will be privileged.

Book review should have been requested to authors by the Editor. Authors should sustain their contention on the book submitted to their attention. Besides, authors of any book review should submit the following information: Title of the book in its original language, full names of authors or editors of the book, edition number of the book,

translator's name if any, publisher's full name, city, volume number if any, number of pages and publishing years. The full name and academic or professional affiliation of the author of any book review should be stated clearly. Book review should not exceed two pages.

Technical communications should refer exclusively to modifications in scientific methods, determinations or errors committed in scientific methods, etc.

Technical communications should not exceed two pages. At the end of a communication, authors full name and particulars should be clearly identified.

When submitting a full-length paper, authors should take the following recommendation into account:

- On the upper right angle of every page, the last name (surname) of author (or the first author) should be typed next to the corresponding page number. Pages should also be paginated.

-When referring to chemicals, IUPAC standards should be preferred.

-Organisms should be denominated according to international standards. Gender and species should be stated unabridged. When using a computer word processor, authors should use italics. When using a typewriter, authors should underline.

-Illustrations (photographs, diagrams, etc.) should be made on top quality materials, the technique of which should allow illustration to be reproduced without special treatments whatsoever. It is advisable that illustrations be the same size as in Acta page. As regards illustrations that must be reduced, authors should see to it that letters, figures, and/or any other element in illustration be bigger-sized on the original so that such letters, figures or elements be still clearly readable once illustration has been reduced. Illustrations should also be sent in triplicate (one original and two copies).

On the reverse of illustration the following elements should be written with a soft lead pencil: Figure corresponding to illustration, last name (surname) of author (or first author). An arrow should point out the upper pan of illustration. Captions to illustration should be typed on a separated sheet.

Authors should be aware that any extra change caused by the printing of illustrations will be levied for each illustration.

-Tables and captions thereof should be submitted on separate sheets. Each page should be paginated with Arabic numerals, according to the order in which tables appear in article.

-Literature references in the text should be given at the appropriate places by numbers between brackets. For example: "Isoenzymes separation was performed by electrophoresis according to a technique developed by Diestz and Lubrano (4)". When referring to an article written by more than one author, the last name (surname) of the first author will be followed by "et al." For example:

"Castañé et al. (5) have been the first researches in..."

• Literature references should be listed under the heading "References". References should be arranged according to the numbers given to citations in the text of article. Format of references is as follows:

• A paper published in a journal.

Malla Reddy P. and M. Bashamohiedeen (1989) Fenvalerate and Cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochim. Hydrobio. 17 (1), 101-107.

• a book: Dix H. M. (1981) Environmental pollution. John Wiley & Sons., New York, p. 286.

A bridged name of journals should be the abridged name that a journal uses.

• Any exceptional modifications to the above mentioned instructions that authors should request will be submitted to the attention of the Editor.

Proofs will be sent to author whose address has been stated in paper. Author should review proof and airmail proof back to the Editor as soon as possible (within 48 hours of receiving proof, in the Argentine Republic).

Author, or first author will receive 10 off prints at no charge.

If author or authors request extra of prints, a charge will be levied.

Author or authors should state the number of extra of prints they wish to receive when they send back the reviewed proof to the Editor. Any correspondence referred to ATA should be sent to:

Acta Toxicológica Argentina – Comité Editorial – Alsina 1441 (1088) Buenos Aires, Argentina  
Telefax: ++54-11-4381-6919.

Exchange is kindly requested with journals the scope and purpose there of are akin to the scope and purpose of "Acta Toxicológica Argentina".

## INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.), (ISSN. 153279286) é o órgão especial de difusão científica da Associação de trabalhos originais, livros, comunicações, actualizações ou revisões, tema de divulgação, comentários bibliográficos, notas técnicas e cartas ao editor. Igualmente serão publicadas notícias relacionadas com diferentes campos da Toxicologia.

Acta Toxicológica Argentina (em adelante "Acta") publicará contribuições em espanhol, português e inglês. Todas serão avaliadas por dois revisores; a seleção deles será atribuição exclusiva do Comité Editorial. Este processo determinará que o mencionado Comité opte por eliminar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido para sua consideração. Em todos os casos os autores receberão cópia sem assinatura da opinião dos avaliadores.

As contribuições científicas originais enviadas à consideração da Acta deverão ajustar-se à seguinte estrutura básica:

• Página 1: título, subtítulo nomes completos do ou dos autores, laboratório ou instituição onde se realizou o trabalho; endereço postal completo, incluindo código postal, telefone e fax; autor ao qual toda a correspondência deverá ser dirigida.

• Página 2: título do trabalho em espanhol, português e inglês; resumos de até 250 palavras, em espanhol, português e em inglês. Três, quatro palavras-chaves em espanhol, português e em inglês.

• Página 3 em seguida: o Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Bibliografia indicada, Títulos de Ilustrações e Quadros com legendas. A extensão máxima destes aportes não deverá superar 8 (oito) páginas. O texto deverá ser escrito com PC

em papel tamanho A4 com espaço duplo, com margens superior, inferior e esquerda de 4 cm. Deverão ser enviados 3 jogos.

Junto com as cópias do manuscrito, os autores deverão enviar uma versão em disquete (de 3 1/2"), em um dos seguintes processadores de texto: WORD for MS-DOS, WORD for MACINTOSH, WORD PERFECT for MS-DOS. Caso os revisores recomendem revisão do trabalho, a nova versão também deverá ser acompanhada de uma cópia em disquete e 3 jogos do texto em papel.

As comunicações breves deverão respeitar um formato semelhante ao indicado para as contribuições científicas. O texto não necessariamente será dividido nas partes indicadas (Introdução, Material e Métodos, etc.); não obstante, deverá conter em forma concisa a informação que corresponde a estas partes. A extensão desta categoria de aportes não deverá superar 3 (tres) páginas.

As revisões, actualizações e temas de divulgação deverão ser o mais conciso possível e sua extensão não excederá de 6 (seis) páginas. Sua redação deverá contemplar leitores com formação científica, porém, estranhos ao tema.

Considerar-se-ão preferentemente as revisões solicitadas pelo Comité Editorial.

Os comentários bibliográficos serão contribuições solicitadas pelo Diretor.

O autor deverá emitir uma opinião fundamentada sobre o trabalho submetido à sua consideração. Além disso, deverá incluir a seguinte informação: título em idioma original, autores, edição considerada, tradutor, editorial e respectivo lugar, o livro ou volume, número de páginas e ano da edição.

Será claramente indicado o nome do comentarista,

instituição à qual pertence e endereço completo. O texto não poderá ocupar mais que 2 (duas) páginas.

As notas técnicas referir-se-ão exclusivamente a modificações de métodos, determinação dos respectivos erros etc. Sua extensão não ultrapassará 2 (duas) páginas; ao final deverão constar os dados que identifiquem claramente os autores.

As cartas do editor serão textos de extensão não superior a 200 palavras e terão o caráter de correspondência científica relacionada com textos publicados anteriormente. Autor ou autores serão devidamente indicados.

Solicita-se aos autores que tenham em conta as seguintes normas ao prepararem seus manuscritos:

- Em todos os casos dever-se-á consignar no ângulo superior direito de cada folha o sobrenome do autor ou do primeiro autor e o número correlativo que corresponde, inclusive as páginas com quadros.
  - No caso de substâncias químicas, se adotará como referência prioritária as normas da IUPAC.
  - Os organismos serão denominados segundo as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico ou sublinhados.
  - As ilustrações (fotografias, gráficos) devem ser confeccionadas com materiais de alta qualidade, com técnicas que possibilitem sua reprodução sem tratamentos especiais. É aconselhável que este material tenha as dimensões de Acta; os autores devem ter em conta que, nos casos de ilustrações nas quais seja necessário proceder a sua redução, o tamanho das letras, números e outros elementos devem ter dimensões maiores para que a nitidez não seja afetada depois da impressão.
  - Serão enviados um jogo de originais e duas cópias.
- Cada uma das ilustrações deverá levar no verso, escrito com lápis suave, o número que lhe corresponder, nome do primeiro autor e mediante uma seta será indicada a posição superior. Os títulos irão em folha separada.
- Os custos adicionais que possam produzir-se pela edição do referido material ficarão a cargo do autor.
  - Os quadros e suas legendas serão apresentados em forma individual, em folhas separadas, identificadas segundo numeração arábica,

segundo a ordem em que apareçam no texto. A localização preferida do quadro no texto será indicada mediante uma seta. Os quadros localizar-se-ão no final de cada manuscrito.

- As referências bibliográficas serão indicadas por números correlativos segundo se apresentem no texto: por exemplo, "A separação das isoenzimas foi feita por electroforese de acordo com a técnica de Dietz e Lubrano (4)".

- No caso de mencionar artigos de mais de dois autores, será indicado o sobrenome do primeiro seguido da expressão e ou: o "Castañé e ou (5) foram os primeiros em ..."

- As referências bibliográficas serão agrupadas segundo o título "Bibliografía citada"; a lista será organizada segundo os números correspondentes. O formato das citações é o seguinte:

- Artigo em publicação periódica: o "Malla Reddy, P. and M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and Cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 17(1), 101-107."

- Livro: "Dix, H.M. (1981), Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."

- As abreviações do nome das revistas serão as que elas mesmas indiquem no texto.

- Qualquer modificação excepcional das normas estipuladas que os autores solicitem será considerada pelo Diretor.

- As provas de impressão serão enviadas ao autor indicado como receptor da correspondência.

- As mesmas serão revistas e devolvidas dentro de 48 horas após recebidas.

- O autor indicado receberá 10 separatas sem despesa. O excedente solicitado sobre essa quantidade será custeado por ele ou demais autores; a quantidade solicitada deverá ser comunicada ao Editor no momento de devolver as provas de impressão.

Toda a correspondência relativa à Acta Toxicológica Argentina

deverá ser dirigida ao Comité Editorial, Alsina 1441, Of. 302 - (1088) Buenos Aires, Argentina. Telefax: ++54-11-4381-6919.

Solicita-se troca com outras publicações tematicamente afins com a Acta Toxicológica Argentina.