

*Acta*  
*Toxicológica*  
*Argentina*

Publicación Oficial de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Volumen 13  
Nº 1  
julio 2005

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.



ASOCIACIÓN  
TOXICOLÓGICA  
ARGENTINA

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

*Acta  
Toxicológica  
Argentina*

## Asociación Toxicológica Argentina

### Comisión Directiva

#### Presidente

Oswaldo 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

#### 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

Oswaldo H. Curci *Poder Judicial de la Nación*

#### Comité de Redacción

Gerardo D. Castro *CEITOX (CITEFA-CONICET)*  
Sandra O. Demichelis *FCNyM, FCM-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*  
Amalia Laborde *Universidad de la República - Uruguay*  
Nelly Mañay *Universidad de la República - Uruguay*  
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*  
Roberto Tapia Zuñiga *Chile*  
Enrique Tourón *Argentina*  
Norma Vallejo *Universidad de Bs. As. - Argentina*  
Eduardo Zerba *CIPEIN - CITEFA / CONICET - Argentina*

## INDICE

(CONTENTS)

EDITORIAL .....	1
NIVELES Y PROBABLE ORIGEN DE LOS HIDROCARBUROS DEL ARROYO PAMPEANO "EL PESCADO" (PCIA. BUENOS AIRES, ARGENTINA) LEVELS AND PROBABLE SOURCES OF HYDROCARBONS FROM THE PAMPEAN "EL PESCADO" STREAM Lavarías Sabrina, Pasquevich Yanina, Arnal Natalie, Demetrio Pablo y Heras Horacio .....	2
ALCOHOL ETÍLICO Y METÍLICO EN BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS ETHYL AND METHYL ALCOHOL IN NON-ALCOHOLIC BEVERAGES Villaamil Lepori Edda Cristina, Rodríguez Girault María Eugenia, Álvarez Gloria, Pascuali Gerardo, Pongelli Valeria, Ridolfi Mirson Daniel, González Daniel y López Clara Magdalena.....	7
DNA DAMAGE IN CHILDREN EXPOSED TO DDT IN A MALARIOUS AREA OF CHIAPAS, MEXICO DAÑO A ADN EN NIÑOS EXPUESTOS A DDT EN UNA ÁREA PALÚDICA DE CHIAPAS, MÉXICO Herrera-Portugal Crispín, Ochoa-Díaz López Héctor, Franco-Sánchez Guadalupe y Díaz-Barriga Fernando .....	12
ACCION INJURIANTE DEL ATAQUE DEL CHUCHO (Chondrichthyes, Fam. Myliobatidae). ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS TEGUMENTOS PRESENTES EN SU ESPINA INJURIOUS ACTION OF THE STING RAY ATTACK (chondrichthyes, Fam. Myliobatidae). HISTOLOGICAL STUDY ON THE TEGUMENTS OF THE STING RAYS SPINES Christiansen H. E. y Cousseau, M. B.....	17
CONTENIDO DE PLOMO, CROMO Y CADMIO EN MOLUSCOS COMESTIBLES DEL GOLFO SAN JORGE (ARGENTINA) CONTENT OF LEAD, CHROMIUM AND CADMIUM IN EDIBLE MUSSELS OF THE GULF SAN JORGE (ARGENTINA) Pérez Adriana Angela, Fajardo María Angélica, Strobl Analia Mabel, Pérez Laura Beatriz, Piñeiro Adrianay López Clara Magdalena.....	20
INDICES - INDEXES / VOLUMEN 11 - VOLUME 11 (2003).....	25
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS.....	26

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**

### **GENETICA TOXICOLOGICA Y EVALUACION DE RIESGO**

La contaminación ambiental siempre ha existido pues es parte inherente a las actividades del hombre. El ser humano es un excelente agente de cambio en el planeta y no escapa a los efectos de la destrucción que él mismo provoca en el ambiente. Esos cambios son el producto de situaciones tales como la eliminación selectiva de especies, la alteración de los hábitats y/o la introducción al ambiente de sustancias nocivas, entre otros. En años recientes se ha prestado más atención a estos cambios no deseados debido a que han aumentado notablemente en la frecuencia así como en la gravedad de las consecuencias. Cada día hay más evidencias de la presión antrópica, y los efectos adversos sobre el ambiente y la salud en general.

Estamos expuestos a decenas de miles de compuestos químicos y cada año entran al mercado otros nuevos, la mayoría de los cuales no han sido evaluados comprensivamente respecto a su toxicidad y posible impacto ambiental. Prueba de ello son los numerosos compuestos químicos que se han utilizado durante años, y más tarde, por los efectos que pudieron comprobarse en la salud o el medio ambiente, han debido prohibirse o eliminarse del mercado. De este modo y como resultado de esta exposición, existe la probabilidad de sufrir algún efecto adverso, quizás el ejemplo más fácil de ilustrar es la aparición de una dada enfermedad.

Teniendo en cuenta los avances del conocimiento científico y tecnológico y el amplio uso de los compuestos químicos tanto en la industria como en la producción agrícola-ganadera, la cosmética, la terapéutica animal, vegetal y humana, cobra importancia el biomonitoreo del efecto que éstos y otros agentes puedan ejercer sobre el material genético de los organismos vivos al formar parte del estilo de vida. Por otra parte, para evaluar el riesgo de poblaciones humanas expuestas a diferentes agentes de tipo físico o químico, deben realizarse dos consideraciones generales: la primera es cualitativa, la que se ocupa de describir las propiedades intrínsecas del agente (identificación del peligro) y la segunda es la cuantitativa, que describe el riesgo que produce una cierta exposición o dosis (caracterización del riesgo). Para el propósito del asesoramiento de riesgo, es importante identificar el mecanismo de inducción de los efectos adversos para la salud y desarrollar métodos que aseguren la cuantificación de las posibles alteraciones genéticas involucradas.

M.A.C.

## NIVELES Y PROBABLE ORIGEN DE LOS HIDROCARBUROS DEL ARROYO PAMPEANO "EL PESCADO" (PCIA. BUENOS AIRES, ARGENTINA)

Sabrina Lavarías(1), Yanina Pasquevich(2), Natalie Arnal(2), Pablo Demetrio(2) y Horacio Heras(1,2)

(1) Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-UNLP, Cát. de Bioquímica, Fac. Medicina;  
(2) Cat. Química Biológica, Fac. Cs. Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calles 60 y 120, (1900) La Plata, Argentina. E-mail: h-heras@atlas.med.unlp.edu.ar

**RESUMEN.** Lavarías S.; Pasquevich Y.; Arnal N.; Demetrio P.; Heras H. Niveles y probable origen de los hidrocarburos del arroyo pampeano "El Pescado" (pcia. Buenos Aires, Argentina). *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 2-6*. Con el objeto de determinar los niveles basales y el probable origen de hidrocarburos (HC) en el arroyo pampeano "El Pescado", afluente del Río de La Plata, se analizaron durante 22 meses muestras de camarones (*Macrobrachium borellii*), sedimento y agua de la región media del curso.

Los HC disueltos en el agua se recuperaron por extracción con hexano, mientras que para las muestras biológicas y de sedimento se compararon primero diferentes técnicas de extracción, seleccionando la que extrajo los HC aromáticos con mayor eficiencia (sonicación con diclorometano-hexano para el sedimento y destilación por arrastre con vapor y diclorometano para las muestras biológicas). Los extractos purificados de HC se analizaron por cromatografía gaseosa en columna capilar con detector de ionización de llama. Se detectó la presencia de trazas de HC en muestras de agua y de tejidos durante el período monitoreado. En las muestras de sedimentos se observó presencia de HC de la serie alifática, principalmente los de cadena impar nC29, nC31 y nC33, y sólo cantidades traza de HC aromáticos. Los HC totales en el sedimento variaron en un rango entre 0,03 y 0,16 µg HC/g p. seco. Para determinar el posible origen (biogénico o antropogénico) de los HC alifáticos se emplearon índices de distribución de alcanos. Se pudo determinar así que el sedimento contenía HC esencialmente de origen biogénico provenientes de plantas superiores, estando por lo tanto libre de contaminación apreciable por HC petrogénicos. Estos resultados aportan los primeros niveles de referencia para monitorear el status de contaminación por HC de este arroyo, y son los primeros realizados en arroyos pampásicos.

**ABSTRACT.** de Roodt A. R.; García S. I.; Gómez C. M.; Estévez J.; Alagón A.; Gould E. G.; Paniagua-Solís J. F.; Dolab J. A.; Curci O. H. Levels and probable sources of hydrocarbons from the pampean "El Pescado" stream (Buenos Aires, Argentina). *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 2-6*. From the beginning of the serotherapy at the end of XIX century, the antibodies administered as therapeutic agents have been used with different emphasis for the treatment of different pathologies. These products come in a high variety of pharmaceutical presentations, although the methods used by the producers to purify antibodies from the hyperimmune plasma with or without enzymatic treatment, have varied very little over the past decades. Despite the present tendency to obtain therapeutic proteins from systems that make use of their *in vitro* expression, the future of the therapeutics for several acute toxic pathologies will remain associated with serotherapy, at least for many years to come. In this review, we discuss on the different type of pharmaceutical presentations of the available antivenoms and antitoxins commonly used for the treatment for the envenomations by venomous animals or the intoxication by bacterial toxins and its relationships with the neutralizing capacity and its therapeutic efficacy.

**Palabras clave:** hidrocarburos, *Macrobrachium borellii*, crustáceo, sedimento, agua, índices de alcanos, antropogénico, biogénico.  
**Key words:** hydrocarbons, *Macrobrachium borellii*, crustacea, sediment, water, alkane indexes, anthropogenic, biogenic.

### INTRODUCCIÓN

Entre las numerosas formas de contaminación ambiental, el impacto de los hidrocarburos (HC) derivados del petróleo sobre ecosistemas acuáticos, es el de mayor repercusión pública<sup>1</sup>. Los cuerpos de agua dulce tanto lóticos como lénticos son sensibles a la contaminación por petróleo e importantes para la salud humana y el ambiente, por ser usualmente usados como fuentes de agua potable y servir como hábitat y fuente de alimento para numerosas especies. La cuenca del Río de La Plata es una de las regiones más contaminadas del país en términos de HC debido a las actividades industriales y portuarias que operan en la zona<sup>2</sup>. Por este motivo la región necesita una urgente evaluación de los efectos ecotoxicológicos de estos contaminantes.

Para obtener información local relevante en estudios dedicados al impacto de contaminantes en el ambiente, es preferible seleccionar especies nativas. En el estudio del nivel de contaminación y evaluación del riesgo ambiental asociado a los HC, deben considerarse variables tales como el tipo y

cantidad de petróleo, la frecuencia de exposición, las condiciones ambientales y la sensibilidad de las especies locales a sus efectos tóxicos. Dentro de un proyecto amplio de evaluación del efecto de HC sobre la biota del Río de La Plata, hemos seleccionado al crustáceo autóctono *Macrobrachium borellii* como posible modelo bioindicador debido a que es un representante de un nivel trófico elevado en la comunidad, y a su proximidad taxonómica con otras especies que son cultivadas en la actualidad y económicamente importantes teniendo en cuenta también que en varios casos, se han seleccionado a los camarones para biomonitorizar la calidad de aguas y sedimentos<sup>3,4</sup>, siendo un requisito previo a la recolección la evaluación del nivel basal de HC presentes en el área de muestreo. Otro motivo se tuvo en cuenta en la elección de esta especie autóctona como bioindicadora: los arroyos pampeanos cercanos a la ciudad de La Plata se caracterizan por su alto nivel de eutrofización<sup>5</sup>, y esta condición es desfavorable para algunos de los organismos comúnmente usados en ensayos toxicológicos, ya que suelen ser poco

resistentes a pequeños incrementos en nutrientes. Por ello los resultados de bioensayos en ambientes pampeanos empleando invertebrados originarios de áreas oligotróficas, pueden ser cuestionables para determinar el estado de contaminación de los tributarios del Río de La Plata, como el arroyo El Pescado<sup>6</sup>.

En nuestro caso se seleccionó como área de muestreo potencial el arroyo El Pescado, en la que se evaluó la presencia de HC en muestras de agua, sedimento y camarones con el objetivo de (a) determinar las cantidades basales de los mismos y sus posibles fuentes utilizando índices de distribución de n-alcanos para comenzar un programa de monitoreo periódico del status de contaminación por HC de este arroyo, y (b) identificar si el área estaba libre de HC antropogénicos y poder así realizar la recolección de *M. borellii* para bioensayos de contaminación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de muestreo y obtención de muestras

El material de estudio provino de un curso de agua que desemboca en el Río de La Plata, conocido como arroyo El Pescado y la zona de muestreo se ubicó en la intersección con la Ruta Provincial N° 11, Km 15 del partido de La Plata.

Se colectaron 3 muestras de sedimento a lo largo de 22 meses. Las muestras se tomaron con un core metálico en los primeros 20 cm, a las que se determinó el porcentaje de humedad y contenido de materia orgánica en sedimentos midiendo la pérdida de peso por calcinación<sup>7</sup>.

Se midió la temperatura y el pH del agua en el arroyo y se recolectaron 3 muestras de agua de aproximadamente 1500 ml a una profundidad de 40 cm de la superficie, se almacenaron a 4 °C y se procesaron dentro de los 2 días. Se recolectaron asimismo 3 lotes de 10 camarones de la especie *Macrobrachium borellii*.

### Extracción de hidrocarburos

Se utilizaron solventes calidad para "Análisis de Pesticidas".

Los HC disueltos en el agua se extrajeron mediante extracción seriada con hexano de acuerdo al manual de métodos de la UNESCO<sup>8</sup>. Inicialmente se compararon tres técnicas de extracción de HC en las muestras de tejidos de camarones en muestras de 5 g: (a) destilación por arrastre con vapor y diclorometano (DCM) según el procedimiento de Ackman y Noble<sup>9</sup> modificado por Ackman y col.<sup>10</sup>; (b) empleando una mezcla de cloroformo: metanol 1:1 (v/v)<sup>11</sup>, y (c) Soxhlet con una mezcla DCM/hexano (1:1; v/v), durante 40 ciclos.

Muestras de 50 g de sedimentos se secaron a 37 °C y se extrajeron los HC aplicando diferentes técnicas: a) saponificación con KOH en metanol, siguiendo el método descrito por la UNESCO<sup>12</sup>. b) Las muestras se extrajeron cuatro veces con la mezcla DCM/hexano (1:1; v/v) y se sonicaron 10 min usando un ultrasonificador, separando la fase

orgánica. El extracto se filtró con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> previamente extraído y se concentró con N<sub>2</sub>, disolviéndolo finalmente en hexano. c) Extracción por Soxhlet siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para las muestras de tejidos. A todas las muestras se les agregó como estándar interno 15 µg de octadeceno (18:1, Accustandard). En todos los casos se realizaron blancos de extracción.

### Análisis de los hidrocarburos mediante cromatografía gas-líquido

Los extractos se purificaron en primer lugar por cromatografía en columnas de sílice. Se hicieron a continuación estudios de recuperación de HC de las matrices utilizando una mezcla de estándares conocida (Tabla 1) (SIGMA, Alltech y Supelco). Los factores de corrección finales se incorporaron a los obtenidos por cromatografía gaseosa en columna capilar con detector de ionización de llama (GLC). Los HC se analizaron por GLC empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 con una columna DB-1 de 60m x 0.25 mm, empleando He como gas portador, según la técnica descrita en Ackman *et al.*<sup>10</sup>. Los componentes fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con los de estándares externos y con los de una fracción hidrosoluble de HC de un petróleo liviano identificada por GLC-MS<sup>13</sup>. Se calculó la concentración de los HC en las muestras con respecto al estándar interno n-eicosano (n-C21) y se corrigió por la respuesta del GLC y la eficiencia de recuperación de la técnica.

### Índices de evaluación

Dado que las muestras naturales son muy complejas, para determinar el posible origen antropogénico o biogénico de los HC del sedimento se emplearon los siguientes índices de distribución de alcanos: (a) El índice bajo/alto peso molecular de HC es el cociente de la suma de los n-alcanos ≤ C20 y la suma de los n-alcanos ≥ C21. Este cociente es usualmente cercano a 1 para algas, plancton y petróleo crudo, mientras que las bacterias sedimentarias, animales marinos, plantas superiores, sedimentos no contaminados presentan valores bajos (<1). (b) El origen petrogénico de estas series también se puede inferir el cociente de la suma de todos los n-alcanos y el C16, este valor es >50 en muestras biogénicas debido a la dominancia de los n-alcanos impares y <15 en muestras contaminadas con petróleo. (c) El índice preferido de carbono (IPC) está dado por la razón entre:  $2(C27 + C29) / (C26 + 2C28 + C30)$ . Los HC petrogénicos muestran un valor cercano a 1, mientras que las plantas vasculares y sedimentos no contaminados presentan un rango entre 3 a 6. Los siguientes tres índices: (d) Alcanos / Isoalcanos ( $\sum C14-C18 / \sum$  isoprenoides), (e) C17 / Pristano y (f) C18 / Fitano evalúan la presencia de petróleo y la biodegradación de n-alcanos. Valores bajos (<1) de estos índices sugieren la presencia de petróleo biodegradado, mientras que valores altos corres-

ponden a baja biodegradación<sup>14</sup>. (g) el cociente pares/impares para el petróleo no muestra predominancia de una u otra serie, a diferencia de las muestras de plantas donde los alcanos impares son alrededor de 8-10 veces más abundantes<sup>15</sup>. Por último (h) el índice del hidrocarburo de mayor concentración denota el n-alcano de concentración más alta. Este índice se encuentra frecuentemente alrededor del C18 para petróleo crudo, mientras que diferentes tipos de algas (tanto macro como microalgas) tienen habitualmente como componentes importantes C15, C17, C19 y C21, y los C23, C25, C27, C29, y C31 predominan en muestras de plantas vasculares terrestres.

**RESULTADOS**

Del estudio comparativo se determinó que las técnicas más adecuadas para recuperar con mayor eficiencia los HC aromáticos son la técnica de sonicación con DCM-hexano en el caso de sedimento (55,76%) y la de destilación por arrastre con vapor y DCM para los tejidos de camarón.(51,07%). El criterio que se tuvo en cuenta en la elección final de ambas técnicas fue el hecho de que los HC aromáticos son los principales responsables del efecto tóxico de los HC en los organismos<sup>16</sup>. Los valores de pH del agua del área de muestreo oscilaron entre 6,7 - 6,9, mientras que la temperatura varió entre una media de 10 °C en invierno y 25 °C en verano. El contenido de materia orgánica de los sedimentos (Tabla 2) fue en promedio del 3,8 % p/p de sedimento seco a lo largo de los 2 años de muestreo. Solo se detectaron trazas de HC en las muestras de agua (sin filtrar) y en camarones. Por el con-

trario, el análisis de las muestras de sedimento mostró la presencia de HC de la serie alifática entre el nC10 y nC35 en una concentración de HC totales que varió entre 0,03 y 0,16 µg HC / g sedimento seco, encontrándose los mayores valores en la época estival (Tabla 2). Sólo se detectaron concentraciones traza de HC aromáticos. El origen de los HC del sedimento suele ser complejo y puede incluir tanto compuestos antropogénicos como biogénicos. Dentro del primero se incluye principalmente al petróleo y también al material orgánico reciclado de diferentes orígenes (aguas servidas, materia orgánica lavada por lluvias o efluentes de plantas de tratamiento). Las fuentes biogénicas pueden incluir por ejemplo, algas, animales, plantas vasculares o bacterias. El análisis cromatográfico de las muestras de HC de sedimento mostró que los principales componentes en todas fueron los alcanos de cadena impar nC29, nC31 y nC33 (ver más abajo). Al aplicar los índices de distribución de alcanos a cada una de las muestras se observó lo siguiente. El índice bajo/alto peso molecular fue pequeño indicando sedimentos no contaminados o presencia de HC de plantas superiores. El origen antropogénico también se pudo inferir del cociente de la suma de todos los n-alcanos y el C16 cuyos valores altos indican muestras biogénicas. El IPC fue >3 en todos los casos indicando nuevamente sedimentos no contaminados y presencia de HC de plantas vasculares. Los índices Alcanos / Isoalcanos, C17 / Pristano y C18 / Fitano mostraron valores altos evidenciando la no contaminación por petróleo (Tabla 2). El índice pares/impares osciló entre 0,3 y 0,5 indicando también presencia de HC de origen vegetal. El HC

**Tabla 1.** Mezcla de hidrocarburos empleada en los ensayos comparativos de técnicas de extracción de muestras biológicas y sedimento.

<b>HC aromáticos</b>	<b>Benceno, Tolueno, Naftaleno, Etilbenceno, o-Xileno, m-Xileno, n-propilbenceno, isopropilbenceno, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,2,4-trimetilbenceno, 1,2,3,4-tetrametilbenceno, o-Dietilbenceno, m-Dietilbenceno, p-Dietilbenceno.</b>
<b>HC alifáticos</b>	<b>Serie par en el rango nC10-C22</b>

**Tabla 2.** Valores de los índices de distribución de alcanos aplicados a las muestras de sedimentos del arroyo El Pescado durante un período de 22 meses.

Índices	06/01	09/01	01/02	02/02	04/02	07/02	08/02	09/02	01/03	02/03	04/03
Bajo/alto	0,65	0,87	0,46	0,52	0,33	0,32	0,27	0,36	0,27	0,60	0,12
n-alcanos/C16	12,74	31,66	23,38	17,68	25,73	20,23	28,08	52,93	28,08	15,45	64,51
IPC	3,40	2,78	3,71	3,91	3,49	3,85	3,02	5,58	3,02	3,76	3,66
Alcano/isopreno	5,99	4,43	3,89	6,99	15,79	16,36	7,97	0,89	7,97	6,75	6,54
C17/Pristano	1,51	0,63	1,70	5,27	1,44	1,52	1,42	3,35	1,42	2,86	0,90
C18/Fitano	2,86	2,24	16,00	9,32	7,56	15,78	7,55	2,09	7,55	45,53	2,10
Pares/impares	0,53	0,54	0,44	0,41	0,39	0,44	0,41	0,28	0,41	0,49	0,25
MH**	7,29	10,71	10,36	15,66	14,25	15,50	11,84	10,18	11,84	9,16	20,30
HC totales *	45,8	29,4	74,8	95,1	76,0	69,8	133,4	112,5	122,2	158,0	79,4
% MO	2,27	2,34	2,19	2,24	3,19	2,47	2,43	2,55	2,64	2,75	3,56

\*\* El HC mayoritario fue en todos los casos nC31, Valores expresados como % (p/p).

\* Expresados como ng HC/g sedimento seco.

Las referencias de los índices se encuentran definidas en el texto.



de mayor concentración fue en todos los casos el nC31 (Tabla 2) seguido del nC29 denotando así la presencia de HC de plantas vasculares terrestres. En síntesis, combinando la información de los 8 índices se pudo demostrar, sin excepción, que los HC del sedimento son de origen biológico esencialmente provenientes de plantas vasculares.

## DISCUSIÓN

La evaluación de la presencia de HC antropogénicos en muestras de agua, sedimento y organismos tuvo como objetivo determinar los niveles de referencia para monitorear el status de contaminación por HC de este arroyo pampeano, así como identificar el posible origen de los HC. Este monitoreo, realizado a lo largo de casi 2 años sólo mostró cantidades traza de HC en las muestras de agua y camarones. Si uno tuviera interés en conocer la historia previa del área, estos datos son buenos indicadores de que el sitio no ha estado sujeto a contaminación por HC en los años previos al muestreo, ya que si bien se puede argumentar que el agua varía su concentración de HC de acuerdo a las condiciones del momento, en sitios de baja energía se puede encontrar petróleo en sedimentos inclusive después de 5 años de haber ocurrido un derrame en el área<sup>17</sup>. Estos HC se pueden liberar a la columna de agua mucho tiempo después de haber ocurrido el derrame como consecuencia del intercambio entre el agua de la columna y la intersticial. De esta manera, o bien se debería de haber detectado la presencia de HC en alguno de los muestreos de agua, o bien especies bentónicas como *Macrobrachium borellii* podrían haber bioacumulado estos HC directamente desde la columna de agua o indirectamente desde el agua intersticial de los sedimentos contaminados. En este sentido el análisis del sedimento también fue indicativo de la escasa presencia en el área de HC petrogénicos, si bien cabe mencionar que se observaron cantidades traza de HC aromáticos. Apoyando este razonamiento, Glegg y Rowland<sup>18</sup> observaron que los niveles de HC en el gasterópodo *Patella vulgata* analizados luego de seis meses del derrame del petrolero "Braer" en las costas escocesas, disminuyeron a valores semejantes a la concentración basal de la región.

El posible origen de los HC de la serie alifática encontradas en el sedimento se identificó aplicando algunos de los índices de distribución de alcanos<sup>19; 20; 15</sup>. Se pudo determinar así que el sedimento contiene HC esencialmente de origen biogénico provenientes principalmente de plantas superiores, estando por lo tanto libre de contaminación apreciable por HC antropogénicos. Es sabido que el tipo de suelo limoso o arcilloso de granulometría fina, como el este arroyo<sup>21</sup> favorece la acumulación de HC. Esto, sumado al importante contenido de materia orgánica (2,5-3,6 %), similar al encontrado en otras zonas del estuario del Río de La Plata<sup>22</sup>, apoyan la hipótesis de que el sitio no ha estado sujeto a contaminación por HC en años,

ya que se sabe que la MO tiene una alta afinidad por los HC. Como ejemplo de la capacidad de retención de HC se puede mencionar un estudio cercano geográficamente realizado en los sedimentos del Río de La Plata de las cercanías de la localidad de Magda-lena. En este sitio con alto contenido de materia orgánica y granulometría semejante a la del arroyo El Pescado se observó la presencia de altas concentraciones de HC petrogénicos retenidas luego de 6 meses de ocurrido un derrame de HC<sup>23</sup>. Graça *et al.*<sup>6</sup> también estudiaron el estado de contaminación del arroyo El Pescado empleando medidas de diversidad de especies y parámetros fisicoquímicos. Este grupo determinó que el arroyo no estaba contaminado en el área cercana a nuestra zona de muestreo basándose en las especies de invertebrados presentes, el oxígeno disuelto y los valores de conductividad del agua.

Se sabe muy poco de la contaminación por HC en los arroyos y ambientes lóticos pampeanos, restringiéndose los estudios al Río de La Plata (i.e. 20, 24). Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan los primeros niveles de referencia para monitorear el status de contaminación por HC de este arroyo, y se espera que sea precursor de estudios similares en otros arroyos pampásicos. El estudio permitió, además, garantizar el empleo de *M. borellii* de este hábitat libre de HC petrogénicos para bioensayos de laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Mendes da Silva, E., Campos Peso-Aguilar, M., Teixeira Navarro, M. F., and de Barros e Azevedo Chastinet, C. (1997). **Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil.** Environ. Toxicol. Chem., 16(1), 112-118.
- AGOSBA-OSN-SHN (1992). **Río de La Plata, Calidad de las Aguas, Franja Costera Sur (San Isidro-Magdalena).** Buenos Aires, Argentina: Dirección de Servicios Especiales, Sub-Dirección Química de Recursos Hídricos.
- Shigehisa, H. and Shiraishi, H. (1998). **Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity.** Environ. Toxicol. Chem., 17(4), 687-694.
- Morales, R. B. C., Pfeiffer, W. C., Guimaraes, J. R. D., Borges, A. L. N., and Campos, A. N. (2000). **Development of sediment toxicity test with tropical peneid shrimps.** Environ. Toxicol. Chem., 19(7), 1881-1884.
- Bauer, D. E., Donadelli, J., Gómez, N., Licursi, M., Ocón, C., Paggi, A. C., Rodríguez Capítulo, A., and Tangorra, M. (2002). **Ecological status of the Pampean plain streams and rivers (Argentina).** Verh. Internat. Verein. Limnol., 28, 259-262.
- Graça, M. A. S., Rodríguez-Capítulo, A., Ocón, C., and Gómez, N. (2002). **In situ test for water quality assessment: a case study in Pampean rivers.** Water Res., 36, 4033-4040.
- Jüingwirth, M. (1979). **The superficial sediments: their characterization and distribution.** En: H. Löffler (Ed.), Neusiedlersee: the Limnology of a Shallow Lake in Central Europe (pp. 139-144). The Hague, Boston, London: W. Junk.

8. UNESCO (1984). **Manual para la vigencia del aceite y de los hidrocarburos del petróleo disueltos o dispersos en el agua del mar y en las playas.** Procedimientos para el componente petróleo del sistema de vigencia de la contaminación del mar (MARPOLMON-P). Manuales y Guías (pp. 1-37). Comisión Oceanográfica Intergubernamental.
9. Ackman, R. G. and Noble, D. (1972). **Steam Distillation: A simple technique for recovery of petroleum hydrocarbons from tainted fish.** J. Fish Res. Bd. Canada, 30, 711-714.
10. Ackman, R. G., Heras, H., and Zhou, S. (1997). **Improvements in recovery of petroleum hydrocarbons from marine fish, crabs and mussels.** In: R.E. McDonald and M. Mossoba (Eds.), *New Techniques and Applications in Lipid Analysis.* (pp. 380-393). Champaign IL: Am. Oil Chem. Soc.
11. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Can. J. Biochem. Physiol., 37(911), 917.
12. UNESCO (1982). **Determinación de los hidrocarburos del petróleo en sedimentos.** Manuales y Guías (pp. 1-35). Comisión Oceanográfica Intergubernamental.
13. Heras, H., Ackman, R. G., and Macpherson, E. J. (1992). **Tainting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by petroleum hydrocarbons during a short-term exposure.** Mar. Pollut. Bull., 24(6), 310-315.
14. Colombo, J. C., Barreda, A., Bilos, C., Cappelletti, N., Demichelis, S., Lombardi, P., Migoya, M. C., Skorupka, C., and Juárez, G. (2004). **Oil spill in Río de La Plata estuary, Argentina: 1- Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils, and biota.** Environ. Pollut., 134(2), 277-289.
15. Commendatore, M., Esteves, J. L., and Colombo, J. C. (2000). **Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia, Argentina. levels and probable sources.** Mar. Pollut. Bull., 11, 989-998.
16. GESAMP (1993). **Impact of oil and related chemicals on the marine environment. Reports and studies No. 50.** London: IMO.
17. Bhattacharyya, S., Klerks, P. L., and Nyman, J. A. (2003). **Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms.** Environ. Pollut., 122(2), 205-215.
18. Glegg, G. A. and Rowland, S. J. (1996). **The Braer oil spill-hydrocarbon concentrations in intertidal organisms.** Mar. Pollut. Bull., 32(6), 486-492.
19. Tran, K., Yu, C. C., and Zeng, E. (1997). **Organic pollutants in the coastal environment off San Diego, California. 2. Petrogenic and biogenic sources of aliphatic hydrocarbons.** Environ. Toxicol. Chem., 16(2), 189-195.
20. Colombo, J. C., Pelletier, E., Brochu, C., & Khalil, M. (1989). **Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Río de La Plata estuary, Argentina.** Environ. Sci. Technol., 23, 888-894.
21. Rodrigues Capítulo, A., M., Ocón, C. and Tangorra, M. (2003). **Una visión bentónica de arroyos y ríos pampeanos.** Biología Acuática, 21, 1-18.
22. Bilos, C., Colombo, J. C., and Rodríguez Presa, M. J. (1998). **Trace metals in suspended particles, sediments and asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de La Plata estuary, Argentina.** Environ. Pollut., 99, 1-11.
23. Moreno, V. J., Iribarne, O. O., Escalante, A. H., Aizpún, J. E., Janiot, L. J., Heras, H., Menone, M. L., Miglioranza, K., Pérez, C., Isacch, J. P., Abib, A. E., and Canepuccia, A. D. (2004). **Monitoring coastal Río de La Plata oil spillage.** Trondheim Conference, Noruega.
24. AGOSBA-OSN-SHN (1992). **Río de La Plata, Calidad de las Aguas, Franja Costera Sur (San Isidro-Magdalena).** Buenos Aires, Argentina: Dirección de Servicios Especiales, Sub-Dirección Química de Recursos Hídricos.

## ALCOHOL ETÍLICO Y METÍLICO EN BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS

\*Edda Cristina Villaamil Lepori; María Eugenia Rodríguez Girault; Gloria Álvarez; Gerardo Pascuali; Valeria Pongelli; Adriana Ridolfi; Daniel Mirson; Daniel González; Clara Magdalena López.

Cátedra de Toxicología y Química Legal- Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA, Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina, Tel/Fax: (+541) 4964-8283/4. E-mail: evillaam@ffy.uba.ar

**RESUMEN.** Villaamil Lepori, E. C.; Rodríguez Girault, M. E.; Álvarez, G.; Pascuali, G.; Pongelli, V.; Ridolfi, A.; Mirson, D.; González, D.; López, C. M. **Alcohol etílico y metílico en bebidas no alcohólicas.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 7-11.* El consumo de jugos por la población infantil y de "amargos" por los jóvenes ha aumentado en los últimos años. La legislación Argentina admite una concentración máxima de etanol en bebidas no alcohólicas de 0,5 mL/dL y no considera la presencia de alcohol metílico.

Se investigaron ambos alcoholes en jugos y bebidas "amargos" en 196 muestras, 97 jugos y 99 "amargos".

La investigación se realizó mediante head-space y cromatografía gaseosa con detector de llama (GC-FID).

Las muestras fueron clasificadas en jugos y "amargos".

El 88% de las 196 muestras analizadas contenían etanol en concentraciones comprendidas entre menores a 0,001 mL/dL (límite de detección) y 1,48 mL/dL y el 8% metanol en concentraciones entre menores a 0,001 mL/dL (límite de detección) y 0,010 mL/dL. El 66,3% de las muestras de "amargos" superan el límite de etanol establecido por el Código Alimentario Argentino y el Codex Alimentarius mientras que los jugos de frutas y vegetales se hallaron por debajo.

Los jugos no siempre son consumidos en su totalidad una vez abierto el envase y suele conservarse a 4° C durante 48 horas o mayor tiempo. En otros 68 jugos se investigaron ambos alcoholes a las 0, 24 y 48 horas luego de abiertos los envases y conservados a 4° C. Se observó un aumento en las concentraciones medias de etanol a las 48 horas de 1,3 veces y de metanol 7,9 veces respecto a la concentración media en los jugos en el envase recién abierto.

Palabras claves: Etanol; metanol; jugos; bebidas amargos; GC-FID

**ABSTRACT.** Villaamil Lepori, E. C.; Rodríguez Girault, M. E.; Álvarez, G.; Pascuali, G.; Pongelli, V.; Ridolfi, A.; Mirson, D.; González, D.; López, C. M. **Ethyl and methyl alcohol in non- alcoholic beverages.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 7-11.* The consumption of fruit and vegetable juices by children and infants and bitter drinks by young people has increased in the last years. The actual legislation in Argentine admits a maximum concentration of 0.5 mL/dL of ethanol in non-alcoholic beverages and disregards the presence of methanol.

It was decided to investigate both alcohols in juices and bitter drinks in 196 samples, 97 juices and 99 bitter drinks. The investigation was carried out by headspace and gas chromatography with flame ionization detector (GC -FID).

Samples were classified as juices and "bitter drinks".

Ethanol was found in 88% of 196 samples at concentration between 0.001 mL/ dL (limit of detection) and 1.48 ml/dl and methanol in the 8 % at concentration between 0.001 mL/ dL (limit of detection) and 0.010 mL/ dL. Ethanol concentrations were upper than those established in both Codex in the 66.3% of "bitter drinks" samples and lower in fruit and vegetable juices.

The juices not always are ingested totally when the container is opened. They are stored at 4° C for more than 48 hours. In others 68 juice were investigated boths alcohols at 0, 24 and 48 hours after containers were opened and stored at 4°C. It was observed an increased of 1.3 times in ethanol median concentrations at 48 hours, and 7.9 times for methanol.

Key words: Ethanol; methanol; juices; bitter drinks; GC-FID

**Palabras clave:** Etanol; metanol; jugos; bebidas amargos; GC-FID.

**Key words:** Ethanol; methanol; juices; bitter drinks; GC-FID

### INTRODUCCIÓN

En Argentina los niños pequeños y los lactantes consumen frecuentemente jugos de frutas y vegetales. El Código Alimentario Argentino<sup>1</sup> los clasifica como bebidas no alcohólicas y admite una concentración máxima de etanol de 0,5% v/v (0,5 mL/dL), en el caso especial del jugo de ananá admite hasta 3 g/Kg y no considera la presencia de alcohol metílico en estas bebidas. El Codex Alimentarius<sup>2</sup> recomienda concentraciones variables tolerables de etanol en las bebidas no alcohólicas comprendidas entre 3 y 5 g/Kg y no considera la presencia de metanol en tales bebidas.

Se ha observado un importante aumento del consumo en los últimos años por parte de la población juvenil, de bebidas amargos las que en adelante denominaremos "amargos". Estas bebidas se fabrican a partir de extractos de diversas hierbas vegetales las cuales se diluyen en agua o jugos de frutas y se expenden como bebidas sin alcohol.

Para los "amargos" se aplica la misma norma anteriormente mencionada<sup>1</sup> respecto al contenido de etanol y metanol.

Es sabido que el etanol es generado en los jugos por fermentación de la glucosa en presencia de levaduras (*Hansenula and Pichia*) y ciertos hongos (*Saccharomyces*). (Francis *et al.*)<sup>3</sup> (Kennes *et al.*)<sup>4</sup> La piel de la fruta es el *habitat* natural de levaduras y microorganismos, por lo cual es posible que por procesos de fermentación de los azúcares presentes en los jugos se genere etanol.

Las frutas una vez recolectadas suelen conservarse, antes de la obtención del jugo, y uno de los problemas observados es la acumulación de metabolitos indeseables. Pesis *et al.*<sup>5</sup> Los mismos autores consideran que la formación espontánea de etanol y metanol, en las frutas no procesadas, no ha sido bien descripta.

Sandhu *et al.*<sup>6</sup>, y Frenkel *et al.*<sup>7</sup>, han señalado que el metanol puede generarse en los jugos de frutas

a partir de la presencia de pectinas mediante la acción de pectidasas.

Trifiro *et al.*<sup>8</sup> recomiendan realizar el análisis de alcoholes y otros compuestos volátiles, los cuales son indicadores de crecimiento microbiano, y resulta esencial para una mejor evaluación de la calidad del producto final.

Los jugos no son consumidos en su totalidad una vez abierto el envase que los contiene. Suelen conservarse en heladera a 4 °C y se consumen durante períodos de tiempo que a veces superan las 48 horas, aún cuando los fabricantes recomiendan consumirlos dentro de las 48 horas, una vez abierto el envase. Es probable que en estas condiciones continúen los procesos enzimáticos con el consiguiente incremento de la concentración de alcoholes.

Teniendo en cuenta el incremento del consumo de estas bebidas no alcohólicas en Argentina y que la presencia de etanol y/o metanol en los jugos y en los "amargos" adicionan un riesgo de aparición de efectos indeseables, particularmente en la población de niños y jóvenes, es que se decidió investigar estos alcoholes en jugos y en los "amargos". Además se investigó la potencial formación de ambos alcoholes durante 48 horas, cuando los jugos son conservados a 4 °C en envases abiertos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Las muestras investigadas en este trabajo se refieren a bebidas listas para el consumo y no productos concentrados o polvos para luego ser diluidos. Las bebidas fueron clasificadas en jugos y amargos de acuerdo a la composición declarada por el fabricante.

Un total de 196 muestras fueron investigadas de diferentes marcas comerciales, de las cuales 99 corresponden a amargos y 97 a jugos. Se denominó "puros" a 28 muestras de jugos y 46 muestras de amargos constituidas por un único jugo de fruta o vegetal o de bebida amargo y "mezclas" a 69 jugos de frutas y 53 amargos con agregado de jugos de frutas.

En otras 68 muestras de jugos se investigaron por duplicado ambos alcoholes a las 0, 24 y 48 horas una vez abierto el envase y conservado a 4 °C. Los criterios de clasificación de las muestras fueron los anteriormente mencionados.

### Procedimiento

La investigación y cuantificación de los alcoholes fue llevada a cabo mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID) y head-space adaptándose el método de Shaw, P.E. *et al.*<sup>9</sup> descriptas en el texto.

Curva de calibración: Se prepararon soluciones mezclas de ambos alcoholes en las siguientes concentraciones: 0,012; 0,062; 0,124; 0,185 y 0,247 mL/dL. En viales de cinco mL fueron colocados 1 mL de cada una de las soluciones mezclas de los alcoholes y 1 mL de la solución del es-

tándar interno (alcohol iso-propílico en una concentración de 0,124 mL/dL, en solución saturada de sulfato de amonio en ácido sulfúrico 0,1N éste último como reactivo liberador). Cada vial fue cerrado herméticamente mediante septos de TFE/silicona y precinto metálico y colocado en un baño de agua a 80°C ± 5°C durante 30 minutos antes de ser inyectado en el cromatógrafo de gases (GC). Cada punto de la curva fue procesado por triplicado. Las curvas fueron controladas mediante soluciones calibradas de etanol de concentraciones 0,05% ; 0,10 % y 0,30 % (p/v) (Sigma Cat. N° 332-11) Las muestras fueron preparadas de igual manera que la curva de calibración utilizándose 1 mL de cada muestra en lugar de las soluciones mezclas de alcoholes. Cada muestra fue procesada por duplicado.

En pruebas preliminares no incluidas en el presente trabajo se investigó la presencia del alcohol incluido el isopropílico en 10 muestras tomadas al azar y no se detectó la presencia del alcohol isopropílico en ninguna de ellas; por dicha razón se decidió utilizar el isopropanol como estándar interno.

### Cromatografía

Se utilizó un GC Hewlett Packard 5890 Series II, Palo Alto, CA. USA. El GC fue operado con una columna de PoraPlot Q (Chrompack) de 0,32 mm i. d. x 25 m de longitud y de 10 µm de espesor del film. La temperatura del horno fue de 160 °C isotérmicamente, la del inyector de 250 °C y la del detector 275 °C. Como gas carrier en la columna se utilizó nitrógeno de alta pureza a una velocidad de 1,95 mL/ minuto y el detector fue suplementado con igual gas a una velocidad de 30 mL/ minuto. El flujo de aire en el detector fue de 380 mL /minuto y el de hidrógeno 30 mL/minuto.

De cada vial de los puntos de la curva y de las muestras fueron tomados, con una jeringa para gases (Hamilton), 500 µl de la cámara de aire los cuales fueron inyectados en el GC.

Para el análisis cualitativo fue calculado el tiempo de retención relativo del etanol y del metanol respecto al del alcohol isopropílico. Se consideró etanol y/o metanol positivo en una muestra cuando el tiempo de retención relativo obtenido fue ± 0,2 %. Mediante la determinación de la curva de regresión, a partir de las relaciones de áreas de cada alcohol respecto al área del estándar interno, se procedió a la cuantificación de los alcoholes en las muestras.

Se determinó el límite de detección (LD) y el de cuantificación (LC) para ambos alcoholes los cuales arrojaron los siguientes valores: 0,001 mL/dL y 0,003 mL/dL respectivamente.

Las diferencias estadísticas entre grupos fueron evaluadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA), Mann-Whitney Test o el test no paramétrico ANOVA de Kruskal-Wallis, con un nivel de confianza del 95% utilizando el programa InStat, GraphPad Software, California, USA (1998)

## RESULTADOS

El 88% de las 196 muestras analizadas contenían etanol y el 8% metanol.

Las concentraciones medias de etanol halladas en los jugos fueron de  $0,036 \pm 0,046$  mL/dL y en los amargos  $0,156 \pm 0,189$  mL/dL. Se encontraron diferencias muy significativas (Mann-Whitney Test) entre los jugos y los amargos ( $p < 0,0001$ ).

En la *tabla 1* se indican los porcentajes de muestras que contenían etanol y/ metanol y en las *tablas 2 y 3* las concentraciones medias y los rangos de concentración hallados de etanol y metanol.

Se hallaron concentraciones de etanol superiores a la máxima permitida ( $0,5$  mL/dL) en el 66,3% del total de muestras de amargos analizadas, correspondiendo un 21,2% a muestras de amargos puros y un 45,1% a amargos mezclas adicionadas de jugos de frutas.

El metanol estuvo presente en el 16,5 % de las muestras de jugos. No se halló metanol en las muestras de amargos.

En los jugos la concentración media de metanol fue de  $0,001 \pm 0,007$  mL/ dL.

A fin de descartar la generación del alcohol isopropílico durante la etapa de almacenamiento en heladera de los jugos abiertos, fueron revisados los datos cromatográficos obtenidos de las muestras recién abiertas y las muestras a las 24 y 48 horas y no se hallaron variaciones significativas entre las áreas absolutas del isopropanol. Esto último demuestra que es poco probable la formación de alcohol isopropílico en concentraciones significativas, durante la etapa de almacenamiento descripta, en los jugos contenidos en recipientes abiertos.

Se observó en el total de jugos estudiados un aumento en las concentraciones medias de etanol al cabo de 48 horas de 1,3 veces y de metanol 7,9 veces respecto a las concentraciones medias presentes en los jugos de los envases recién abiertos.

En la *tabla 4* se indican las concentraciones medias de etanol y metanol en los jugos recientemente abiertos, a las 24 y a las 48 hs habiendo sido conservados a  $4^\circ\text{C}$ .

**Tabla 1.** Porcentaje de muestras con etanol y/o metanol (n=196).

Jugos		Amargos	
% Muestras con Etanol	% Muestras con Metanol	% Muestras con Etanol	% Muestras con Metanol
76,3	16,5	100	0

**Tabla 2.** Etanol - Concentraciones medias y rangos de concentración en bebidas "puras" (n=74) y "mezclas" (n=122)

Clase	Sabor	Bebidas puras		Bebidas mezclas	
		Conc. media $\pm$ SD (mL/dL)	Rango (mL/dL)	Conc. media $\pm$ SD (mL/dL)	Rango (mL/dL)
Jugos	Manzana	$0,07 \pm 0,04$	0,011 - 0,118	$0,02 \pm 0,02$ (*)	< LD - 0,04
	Citricos	$0,06 \pm 0,07$	< LD - 0,222	$0,02 \pm 0,03$ (*)	< LD - 0,08
	Frutas varias	$0,03 \pm 0,03$	LD - 0,08	$0,04 \pm 0,04$	< LD - 0,42
	Vegetales	< LD	-	< LD	-
Amargos		$0,50 \pm 0,22$ (**)	0,09 - 1,48	$0,60 \pm 0,14$ (**)	$0,39 \pm 1,02$

LD = Límite de detección. (\*) =  $p < 0,05$ . (\*\*) =  $p < 0,007$

**Tabla 3.** Metanol- Concentraciones medias y rangos de concentración en bebidas "puras" (n=74) y "mezclas" (n=122)

Clase	Sabor	Bebidas puras		Bebidas mezclas	
		Conc. media $\pm$ SD (mL/dL)	Rango (mL/dL)	Conc. media $\pm$ SD (mL/dL)	Rango (mL/dL)
Jugos	Manzana	$0,002 \pm 0,005$	LD - 0,014	$0,001 \pm 0,001$	< LD - 0,010
	Citricos	$0,003 \pm 0,002$	< LD - 0,07	< LD	-
	Frutas varias	< LD	-	$0,001 \pm 0,001$	< LD - 0,010
	Vegetales	< LD	-	< LD	-
Amargos		< LD	-	< LD	-

LD = Límite de detección

**Tabla 4.** Concentraciones medias, desviaciones estándar (SD) y rangos de concentración de etanol y metanol en los jugos conservados a  $4^\circ\text{C}$  en envases abiertos (n= 68)

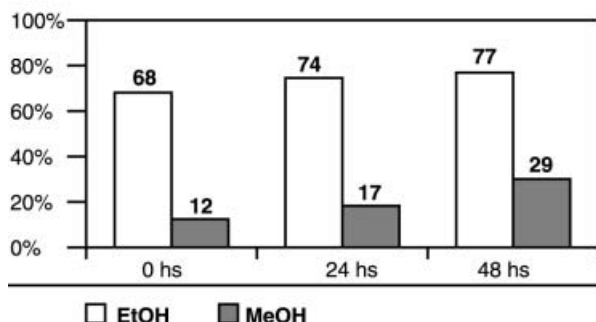
Tiempo	Etanol		Metanol	
	Conc. media $\pm$ SD mL/ dL	Rango mL/ dL	Conc. media $\pm$ SD mL/ dL	Rango mL/ dL
0 hs	$0,037 \pm 0,07$	< LD - 0,233	$0,0006 \pm 0,02$ (*)	< LD - 0,010
24 hs	$0,043 \pm 0,07$	< LD - 0,281	$0,0016 \pm 0,05$	< LD - 0,025
48 hs	$0,049 \pm 0,08$	< LD - 0,395	$0,0048 \pm 0,08$ (*)	< LD - 0,059

LD = Límite de detección. (\*) =  $p < 0,01$

Se hallaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) solo entre las concentraciones medias de metanol a las 0 y 48 horas y no se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones medias de etanol en función del tiempo. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones medias a 0 y 24 horas y entre 24 y 48 hs.

En la figura 1 se indican los porcentajes de muestras que contienen etanol y metanol a las 0, 24 y 48 horas luego de abiertos los envases y conservado a 4 °C.

**Figura 1.** Porcentajes de muestras con etanol y/o metanol en jugos a las 0, 24 y 48 horas de abiertos los envases (n= 68)



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Considerando las bebidas puras y mezclas, la frecuencia de la presencia de etanol no muestra diferencias entre ambos grupos (83% y 79%).

En las muestras analizadas se observaron diferencias muy significativas ( $p < 0,006$ ) entre las concentraciones de las bebidas puras y mezclas. Resultó muy significativa la diferencia en las concentraciones de etanol entre las bebidas "amargos" puras y mezclas ( $p < 0,006$ ). Comparando las concentraciones medias de los jugos "mezclas" y de los amargos "mezclas" los primeros resultaron menores que los segundos. Esto indicaría en el primer caso un efecto de dilución o de inhibición del proceso de fermentación con la consiguiente disminución de la concentración de etanol. En el caso de las bebidas amargas habría un mayor aporte de etanol como consecuencia de los procesos fermentativos a partir del contenido de azúcar del jugo de fruta y de las enzimas necesarias para su producción.

Goldberger *et al.*<sup>10</sup> mencionan la presencia de etanol en bebidas no-alcohólicas en concentraciones comprendidas entre 0,04 y 0,96 g/L correspondientes a 0,005 y 0,12 mL/dL.

En jugos frescos, pasteurizados, concentrados y esterilizados Shaw, P.E. *et al.*<sup>9</sup> señalan concentraciones mínimas de etanol comprendidas entre 0,002 y 0,059 mL/dL y máximas entre 0,081 y 0,180 mL/dL. En los mismos jugos las concentraciones extremas de metanol fueron: mínimas entre 0,000 y 0,008 mL/dL y máximas entre 0,003 y 0,024 mL/dL.

Las concentraciones halladas en los jugos del pre-

sente trabajo son similares a las indicadas por los autores antes mencionados. No se han encontrado datos bibliográficos de niveles de alcoholes en los amargos.

Es de destacar que en los jugos puros de manzana y en los amargos el etanol fue hallado en el 100% de las muestras.

La presencia observada de etanol en los jugos es debida a procesos de fermentación del azúcar presente en los mismos que evidentemente ocurren durante el proceso de manufactura de estas bebidas. La variabilidad de las concentraciones de etanol dependen del contenido de azúcar (Kennes *et al.*)<sup>4</sup>, y del pH. (Frenkel *et al.*)<sup>7</sup>. Estos autores indican que un pH comprendido entre 3,3 y 5,0 favorece la fermentación de la glucosa.

El procedimiento de extracción del jugo por alta presión, el tratamiento térmico y el posterior estacionamiento de los jugos modifica los componentes volátiles. (Yen *et al.*)<sup>11</sup>. Estos mismos autores señalan que han hallado un incremento de la concentración de metanol y etanol particularmente durante el almacenamiento en fábrica. Pesis *et al.*<sup>5</sup> han observado un aumento de la concentración de etanol durante el almacenamiento de la fruta en atmósferas controladas y por períodos de 4 semanas a 2 °C, mientras que luego de un día de recolectada la fruta el etanol no es detectado. Esto indica que el almacenamiento de la fruta o del jugo favorece la formación de ambos alcoholes. Es probable que los procesos de pasteurización o esterilización a los que son sometidos los jugos no sean totalmente eficaces para evitar los procesos fermentativos y la acción de las pectidasas. De acuerdo a los resultados obtenidos en los envases de jugos conservados a 4 °C, se evidencia que persisten los procesos de fermentación, dado el incremento observado de la concentración de ambos alcoholes al cabo de las 48 horas y de la frecuencia de aparición.

La presencia de etanol en los amargos podría ser consecuencia de los procesos de extracción con etanol a que son sometidas las hierbas para obtener los extractos que las componen.

Aunque las concentraciones de etanol halladas en los jugos se hallan por debajo del límite máximo establecido en el Código Alimentario Argentino<sup>1</sup> y en el Codex Alimentarius<sup>2</sup> su presencia es significativa ya que estos jugos son consumidos, y se recomienda su administración, a bebés y niños pequeños.

No es el caso de los amargos ya que el 66,3% de las muestras estudiadas superan el límite máximo establecido para bebidas no-alcohólicas.

Comparando los niveles de metanol en los jugos de recipientes recientemente abiertos y los niveles de los mismos luego de 48 horas de conservados en heladera, se observa un aumento en el número de muestras que lo contienen (12 a 29%).

Gruner *et al.*<sup>12</sup> han señalado que en un período de tiempo de 34 días la concentración de metanol en diferentes clases de jugos de frutas aumenta hasta

concentraciones de 600 mg/Kg (0,047 mL/dL), mientras que es apenas detectable en los 2 primeros días de obtenidos los jugos.

Lindinger *et al.*<sup>13</sup> han observado pequeñas cantidades de metanol en el organismo humano como consecuencia del consumo de pectinas presentes en las frutas. Lissau *et al.*<sup>14</sup> han estimado que desde el punto de vista nutricional debe considerarse el consumo del metanol. Esta sustancia puede contribuir al desarrollo de cirrosis hepática no-alcohólica en humanos según Lissau *et al.*<sup>14</sup>. Teniendo en cuenta la contribución a las dietas del metanol presente en los jugos, sería importante considerar el aumento del riesgo de efectos adversos que podría provocar, Lissau *et al.*<sup>14</sup> especialmente en la población infantil.

El análisis de ambos alcoholes en bebidas no alcohólicas, indicadores de riesgo potencial a la salud humana, es esencial para una mejor evaluación de la calidad del producto final.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Código Alimentario Argentino. (1992) Capítulo XII. **Bebidas hídricas, agua y agua gasificada, Jugos**. Art. 1040, Art. 1041 y Art. 1064, de la Canal y Asociados, Buenos Aires, 344-349 pp.

2. FAO/WHO Codex Alimentarius (1997) Volume 6. **Fruit Juices and Related Products**. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. CD Version. Rome.

3. Francis J. y Harmer P.W. (1988) **Zumos de frutas y bebidas refrescantes**. M. D. Ranken, Acribia, Zaragoza 305- 308 pp.

4. Kennes C.; Veiga M. C.; Dubourguier H. C.; Touzel J. P.; Albagnac G.; Naveau H.; Nyns E. J. (1991) **Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate**. Applied Environmental Microbiology, 57, 1046-1051

5. Pesis E.; Dvir O. ; Feygenberg O. ; Ben Arie R. ; Ackerman M. ; Lichter A. (2002) **Production of acetaldehyde and ethanol during maturation and modified atmosphere storage of litchi fruit**. Postharvest Biology and Technology, 26, 157-165

6. Sandhu, D. K.; Joshi, V. K. (1994) **Comparative fermentation behavior and chemical characteristics of *Saccharomices* and *Zymomonas* fermented culled apple juice**. Indian Journal of Experimental Biology, 32, 873-876.

7. Frenkel C, Peters J S, Tieman D M, Tiznado M E, Handa A K. (1998) **Pectin methylesterase methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit**. Journal of Biological Chemistry, 273, (8) 4293-4295.

8. Trifiro, A.; Saccani, G.; Gherardi, S.; Vicini, E.; Spotti, E.; Previdi, M. P.; Ndagijimana, M.; Cavalli, S.; Reschiotto, C. (1997) **Use of ion chromatography for monitoring microbial spoilage in the fruit juice industry**. Journal of Chromatography, 770, 243-252.

9. Shaw, P. E.; Buslig, B. S.; Mozonas, M. G. (1993) **Classification of Commercial Orange Juice Types by Pattern Recognition Involving Volatile Constituents Quantified by Gas Chromatography**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41, 809-813.

10. Goldberger B.A; Cone E.J.; Kadehjian L. (1996) **Unsuspected Ethanol Ingestion Through Soft Drinks and Flavoured Beverages**. Journal of Analytical Toxicology, 20, 332-333.

11. Yen, G. C.; Lin, H. T. (1999) **Changes en volatile flavor components of guava juice with high-pressure treatment and heat processing and during storage**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2082-2087.

12. Gruner O., Bilzer N., Liebmann J. (1994) **Methanol formation in vitro and in vivo (methanol formation after pectin administration)**, Blutalkohol, 31, 228-232.

13. Lindinger W.; Taucher J.; Jordan A.; Hansel A.; Vogel W. (1997) **Endogenous production of methanol after consumption of fruit**. Alcoholism Clinical and Experimental Research, 21, 939-943.

14. Lissau, B.G.; Pedersen, P.B.; Petersen, B.R.; Budolfson, G. (1998) **Safety evaluation of a fungal pectinesterase enzyme preparation and its use in food**. Food Additives and Contaminants, 15, 627-636.

## DNA DAMAGE IN CHILDREN EXPOSED TO DDT IN A MALARIOUS AREA OF CHIAPAS, MEXICO

Crispín Herrera-Portugal(1), Héctor Ochoa-Díaz López(2), Guadalupe Franco-Sánchez(1) y Fernando Díaz-Barriga(3)

1. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Químicas. Laboratorio de Toxicología ambiental.
2. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR)
3. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Pediátrica Ambiental, Facultad de Medicina.

Correspondencia: Crispín Herrera-Portugal. Facultad de Ciencias Químicas/UNACH. Km. 2 Carretera a Puerto. Madero. CP 30700. Tapachula, Chiapas. México. Fax: +52-962-6262461. E-mail address: cportugal@prodigy.net.mx

**ABSTRACT.** Crispín Herrera-Portugal C.; Ochoa-Díaz López H.; Franco-Sánchez G. and Díaz-Barriga F. **DNA damage in children exposed to DDT in a malarious area of Chiapas, México.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 12-16.* DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] was widely used in Mexico for the malaria control program. Therefore, in this study, the potential DNA damage associated with exposure to DDT and DDE of 30 children living in DDT sprayed areas of Chiapas, México was assessed using Comet Assay. The results were compared with 30 controls of comparable age and sex, who were living in areas less exposed to DDT. Samples of whole blood were obtained to measure DDT, DDE and to carry out the Comet Assay. The children living in DDT sprayed areas had significant greater means of DDT and DDE than controls, obtaining 15.9 +/- 8.2 and 58.24 +/- 29.2  $\mu$ g/L respectively, whereas controls had 1.9 +/- 3.6 and 9.2 +/- 5.7  $\mu$ g/L, respectively. There was also statistically significant differences in comet tail's mean length between the two groups examined (mean 26.83 +/- 6.05 versus 17.13 +/- 3.69  $\mu$ m,  $p < 0.001$ ) and tail moment (mean 7.13 +/- 2.9 versus 1.21 +/- 2.19,  $p < 0.001$ ). Regression analysis showed a positive association between blood levels of DDT, DDE and DNA damage, measured as comet tail length (DDT  $r^2 = 0.54$  and DDE  $r^2 = 0.64$ ,  $p < 0.001$ ) and tail moment (DDT  $r^2 = 0.51$  and DDE  $r^2 = 0.56$ ,  $p < 0.001$ ). The findings of the present study suggest that exposure to DDT and metabolites in DDT sprayed communities can cause DNA damage.

**RESUMEN.** Crispín Herrera-Portugal C.; Ochoa-Díaz López H.; Franco-Sánchez G. y Díaz-Barriga F. **Daño a ADN en niños expuestos a DDT en una área palúdica de Chiapas, México.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 12-16.* El DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano] fue ampliamente usado en el programa de control del paludismo en México. Por esto, en el presente estudio, el potencial daño a ADN asociado con la exposición a DDT y DDE de 30 niños residentes de áreas rociadas con DDT en Chiapas, México, fue evaluada usando el ensayo Cometa. Los resultados fueron comparados con 30 controles comparables en edad y sexo, quienes vivían en áreas con menos exposición al DDT. Se obtuvieron muestras de sangre total para medir DDT, DDE y llevar a cabo el ensayo cometa. Los niños residentes de áreas rociadas con DDT tuvieron una concentración sanguínea media de DDT y DDE significativamente más alta que los controles, obteniendo 15.9 +/- 8.2 y 58.24 +/- 29.2  $\mu$ g/L respectivamente, mientras que los controles tuvieron 1.9 +/- 3.6 y 9.2 +/- 5.7  $\mu$ g/L, respectivamente. Se encontró diferencia significativa en los valores medios de la cola del cometa entre los dos grupos examinados (media 26.83 +/- 6.05 versus 17.13 +/- 3.69  $\mu$ m,  $p < 0.001$ ) y momento de cometa (media 7.13 +/- 2.9 versus 1.21 +/- 2.19,  $p < 0.001$ ). El análisis de regresión mostró una asociación positiva entre los niveles sanguíneos de DDT, DDE y daño a ADN, medidos como longitud de cola de cometa (DDT  $r^2 = 0.54$  y DDE  $r^2 = 0.64$ ,  $p < 0.001$ ) y momento del cometa (DDT  $r^2 = 0.51$  y DDE  $r^2 = 0.56$ ,  $p < 0.001$ ). Los resultados del presente estudio sugieren que la exposición a DT y su metabolitos en comunidades rociadas con DDT puede causar daño a ADN.

**Key words:** DDT; DDE; Malaria; Comet assay; DNA damage.

**Palabras clave:** DDT, ensayo cometa, daño a ADN.

### INTRODUCTION

DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] has been widely used in Mexico by the Malaria Control Programme<sup>24</sup>. However, due to the environmental persistence and the fact that it was spread for more than 40 years, many individuals have been exposed to it<sup>28,27,16,25,17</sup>. Among the main DDT's effects on health, it is the genotoxic one<sup>1</sup>.

The Comet Assay, also called as the Single Cell Gel electro-phoresis Assay (SCGE), is a simple, fast and sensitive technique for analyzing and measuring DNA damage individual mammalian cells. The Assay has applications in testing novel chemical for genotoxicity, monitoring and molecular epidemiology, and fundamental research in DNA damage and repair<sup>14,3</sup>. The Comet Assay essentially measures the sizes of DNA fragment within the cell. The end point measured by traditional Comet Assay is a mixture of direct strand break and DNA damage which is converted to strand breaks by alkaline treatment. The label of DNA damage is largely determined by the length of the comet tail or by the "tail moment" (the length of the comet tail

multiplied by the intensity of fluorescence in the tail)<sup>3</sup>.

There are many studies of DNA damage using the SCGE, but most of them have been carried out in workers occupationally exposed to pesticides mixtures<sup>5,15,33,20,13,26,21,7</sup>, other studies have been undertaken in: workers exposed at waste disposal<sup>9</sup>, smokers<sup>12</sup>, workers exposed to lead<sup>4</sup>, children exposed to arsenic and lead<sup>32</sup>. DNA damage in blood cells has also been reported in studies in vitro and in women chronically exposed to DDT in Mexico, obtaining a significant association between blood levels of DDT, DDE, DDD and DNA damage<sup>32</sup>. A study on genotoxicity in rats and mice and analyzed the effects of different xenobiotics, by means of SCGE, finding p/p-DDT in different organs of the animals studied<sup>22</sup>. Another study, showed DNA damage twenty four hours after the administration of DDT in rats<sup>13</sup>.

None of the mentioned studies was carried out in children of malarious areas who are at high risk for exposure to DDT and their metabolites. Children might have been exposed to DDT by ingesting con-



taminated soil or dust, maternal milk and fish and dairy products<sup>1</sup>. The human exposure to DDT can have adverse consequences, mainly in children who are particularly vulnerable to this pollutant. In this context, to evaluate the exposure and the related damage in these exposed human populations to persistent pesticides as the DDT is an urgent need. Thus, the present study focuses on the problem of the genotoxic effects of DDT<sup>16</sup> and its metabolites in a non occupational scenario among children of DDT sprayed areas.

## METHODS

**Population.** A sample of 60 children aged 6 to 12 years living in communities of the Soconusco region in the Mexican state of Chiapas were studied. In order to get different levels of exposition to DDT, two different areas were included in the sample. The high exposure community (HEC) (*Cigüeña*) has a recent history of domestic DDT spraying (1957-2000) and agricultural use of this insecticide for the last 30 years. The low exposure community (LEC) (*Faja de Oro*) has a history of domestic DDT spraying from 1957 to 1980. This community does not belong to an agricultural area. After having obtained an informed consent from the parents, blood samples (3 ml) were collected from children and a questionnaire was applied to their parents in order to gather sociodemographic data, duration of breastfeeding, fish consumption frequency, smoking, history of use of DDT in the community and exposure to other pesticides. The questionnaire was applied during 20 minutes by trained personnel. The fieldwork was carried out during 2003.

**Chromatographic Analysis.** Blood samples were collected into Vacutainer tubes containing sodium heparin. The samples were immediately frozen at -30°C until they were analyzed. To analyze DDT and its metabolites in blood samples the method described by Guardino *et al*<sup>17</sup> with some modifications described by Yañez *et al*<sup>18</sup> was used. Quantitative analysis was performed by gas chromatography using an Agilent Technologies model 6890 equipped with ECD (electron capture detector), using a HP-5MS 5% Phenyl methyl siloxane column, 30 m x 0.25 mm ID and 0.25 µm film thickness. Column temperatures initial 80°C (1 min), final 290°C (rates: 30°C/min up to 180°C, 3°C/min up to 250°C and 20°C/min up to 290°C), injector temperature: 250°C, detector temperature: 320°C. Helium was used as the carrier gas at a linear velocity of 1.5 ml/min and make up of Nitrogen at 60 ml/min.

**Comet assay.** Single cell electrophoresis was performed as described by Singh *et al*<sup>19</sup>. Immediately after the blood sample was obtained, cells of whole blood were set in a layer of 0.5% low-melting-point agarose on a base layer of 0.5% standard agarose, and lysed for minimum of 24 hours at 4°C in 10 mM Tris-HCl pH 10, 2.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA, 10%

DMSO and 1% Triton X-100. Then, the slides were placed in electrophoresis alkaline buffer (300 mM NaOH and 1.0 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 13) and the embedded cells were exposed for 20 min to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile damage. Electrophoresis was performed in the same buffer (PH> 13) for 20 min by applying an electric field of 25 V and adjusting the current to 300 mA. All technical steps were conducted at very dim indirect light. After electrophoresis, the slides were first washed gently with 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) to neutralize the alkali, and afterwards were drained. The slides were washed with absolute ethylic alcohol. For evaluation of DNA damage, the slides were stained by adding 20 µL of ethidium bromide and a coverglass was placed over the gel. The extent of DNA migration was analyzed in 100 randomly selected cells (50 cell from each of two replicate slides) using a epifluorescent microscope. In the damage cells (cells with "comets") DNA migration was measured by image analysis as the length tail and tail moment, using the software Kinetic Imaging Komet V 4.0.

**Statistical Analysis.** A comparison analysis between the mean blood concentrations of DDT and DDE in children was done in order by area of residence. DNA damage was analyzed by area of residence which was clasified in low exposure and high exposure areas on the basis of their history of DDT spraying. The means of DNA migration cells among individuals from the two areas were analyzed by oneway variance analysis (ANOVA). Other variables as age, sex smoking and exposure to other pesticides were included in the analysis. Regression analysis was also used to study the association between the exposure to DDT and DNA damage. STATA V 8 was used for the statistical analysis (Texas, USA).

## RESULTS

### DDT and metabolites

Differences in mean blood levels of DDT and DDE among children living in the different communities were statistically significant (p<0.01). A higher concentration of DDT and DDE can be observed in the HEC (mean and SD: 15.9 +/- 8.2 and 58.24 +/- 29.2 µg/L respectively) when compared to the LEC (1.9 +/- 3.6 and 9.2 +/- 5.7 µg/L respectively). The mean blood concentration of DDE was six times higher and that of DDT was eight times higher in children living in the HEC than children of the LEC.

### Comet assay

Significant differences of the migration of DNA (measured as tail length and tail moment) were observed in cells of individuals living in the HEC, compared with those living at the LEC (*Table 1*) (p <0.001). The mean of tail moment was two times higher and that of tail length was one and a half times higher in children living in the HEC than those living in the LEC (*Table 1*).

Regarding the association between blood levels of DDT and DDE with DNA damage in the HEC, a significant positive association was observed (Table 2) ( $p < 0.001$ ), for both DDT and DDE. An increment in the migration from DNA when increasing the blood levels of DDT and DDE, was observed. When a regression between the migration of DNA and the blood levels of DDT and DDE, including all the children (HEC and LEC) was carried out, a significant and positive association was also observed (Table 3) ( $p < 0.001$ ). Statistically significant associations persist when the data were adjusted by potential confounders such as age, sex, gender, smoking and exposure to other insecticides.

**DISCUSSION AND CONCLUSIONS**

The results of this study show that DNA damage measured as migration, is higher in the HEC, compared to the results obtained in the LEC ones. Taking into account that levels of DDT and DDE in the HEC were higher, we could conclude that a higher level of exposure to DDT might have caused DNA damage in this population. The obtained results agree with other studies of DNA damage related to DDT in humans<sup>31</sup>, though these studies were carried out in mature women and this study was carried out in children both have provided evidence of the association between the blood levels of DDT and its metabolites DDE and DDD and the

apoptosis frequency<sup>19</sup>. It is important to point out that the measures of migration of DNA (tail length) found in the HEC (mean = 26.86) were greater than the ones found in India<sup>7</sup> in workers occupationally exposed to pesticides (mean = 19.23). The effect of DNA damage detected in the studied population can cause long term problems such as immunosuppression and cancer, as it has been showed in previous studies analyzing the relationship between DNA damage and health problems<sup>2,29</sup>.

It was found a significant association between DNA migration (tail length and tail moment) and the blood levels of DDT and DDE in the HEC and the LEC. This association remained significant when it was adjusted by factors that have been associated with DNA damage, such as age, gender and smoking<sup>18</sup>.

According to the models developed (table 3), DDT and DDE explain 54% and 64% of the variance of tail length, and 51% and 56% of the variance of tail moment respectively. Therefore, these findings suggest strongly that exposure to DDT might cause DNA damage. In conclusion, the results of the present study suggest that chil-

**Table 1.** DNA damage in children living in communities of high and low exposure. Tail length ( $\mu\text{m}$ ) and tail moment.

	Group	n	Mean	S.D.	Range
TAIL LENGTH	LEC	30	17.13	3.69	10 – 23
	HEC	30	26.86*	6.05	20 – 46
TAIL MOMENT	LEC	30	3.50	1.21	1.58 – 7.0
	HEC	30	7.13*	2.19	3.01 – 11.66

DNA damage was measured by image analysis in 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides). LEC is the low exposure community, HEC is the high exposure community. \* $p < 0.001$  (Differences between means were tested by One-Way ANOVA)

**Table 2.** Regression analysis between DNA damage cells ( $\mu\text{m}$ ) and blood levels of DDT and DDE in children living in high exposure community

	Compound	r	r <sup>2</sup>	p	CI (95%)
TAIL LENGTH	DDT	0.38	0.27	<0.001	0.14 – 0.62
	DDE	0.13	0.47	<0.001	0.08 – 0.19
TAIL MOMENT	DDT	0.11	0.17	<0.05	0.02 – 0.20
	DDE	0.04	0.28	<0.001	0.02 – 0.063

Regression was done with 30 children living in high exposure community. DNA damage was measured by image analysis in 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides). Data were adjusted for age, gender, smoking and exposure to other insecticides.

**Table 3.** Regression analysis between DNA damage cells ( $\mu\text{m}$ ) and blood levels of DDT and DDE in children living in high and low exposure communities.

	Compound	r	r <sup>2</sup>	p	CI (95%)
TAIL LENGTH	DDT	0.54	0.54	<0.001	0.41 – 0.67
	DDE	0.17	0.64	<0.001	0.14 – 0.20
TAIL MOMENT	DDT	0.19	0.51	<0.001	0.14 – 0.24
	DDE	0.06	0.56	<0.001	0.05 – 0.07

Regression was done with 60 children (30 living in low exposure areas and 30 in high exposure community). DNA damage was measured by image analysis in 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides). Values were adjusted for those confounders listed in Table 2.

dren living in DDT sprayed areas who have been exposed to DDT during past health programmes for malaria control might have suffered DNA damage, which could probably be associated to such exposure. Therefore, it may represent a potential hazard to their health at long term.

### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Fondo para la Modernización de la Educación Superior. México (FOMES 2000-08-07)  
 “The work described in the manuscript was conducted in accordance with national and institutional guidelines for protection of human subjects”

### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Fondo para la Modernización de la Educación Superior. México (FOMES 2000-08-07)  
 “The work described in the manuscript was conducted in accordance with national and institutional guidelines for protection of human subjects”

### REFERENCES

1. ATSDR . (2002) **Toxicological profile for DDT, DDE and DDD**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia. Department of Health and Human Services.
2. Bosken C.H, Wei Q, Amos C.I, Spitz M.R. (2002) **An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer**. J Natl Cancer Inst; 94: 1091-9.
3. Collins A.R. (2004) **The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations**. Mol Biotechnol. 26:249-61
4. Danadevi K, Rozati R, Saleha Banu B, Hanumanth Rao P, Grover P. (2003) **DNA damage in workers exposed to lead using comet assay**. Toxicology. 187: 183-93
5. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. (2002) **Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay**. J. Appl. Toxicol. 22:249-55
6. Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. (2000). **Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay**. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. Mutat. Res. 20: 279-85
7. Grover P, Danadevi K, Mahboob M, Rozati R, Banu BS, Rahman M.F. (2003) **Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay**. Mutagenesis. 18:201-5.
8. Guardino, X, Serra, C, Obiols, J, Rosell, M.G., Berenguer, M.J., López, F., and Brosa, J. (1996) **Determination of DDT and related compounds in blood samples from agricultural workers**. J. Chromatogr. A 719: 141-147
9. Hartmann A, Fender H, Speit G. (1998) **Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay**. Environ Mol Mutagen. 32:17-24

10. Hassoun E, Bagchi M, Bagchi D, Stohs S.J. (1993) **Comparative studies on lipid peroxidation and DNA-single strand breaks induced by lindane, DDT, chlordane and endrin in rats**. Comp Biochem Physiol C. 104: 427-31.
11. Hauser R, Singh NP, Chen Z, Pothier L, Altshul L. (2003) **Lack of an association between environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE and DNA damage in human sperm measured using the neutral comet assay**. Hum. Reprod. 18:2525-33
12. Hininger I, Chollat-Namy A, Sauvaigo S, Osman M, Faure H, Cadet J, Favier A, Roussel A.M. (2004) **Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers**. Mutat Res. 558:75-80.
13. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. (2000) **Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies**. Mutat. Res. 463: 13-31
14. Kim BS, Park JJ, Edler L, Von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Gotzes F, Thielmann H.W (2002) **New measure of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (comet) assay**. Mol Mutagen. 40:50-6
15. Lebailly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemeney D, Godard T, Sichel F, LeTalaer JY, Henry-Amar M, Gauduchon P. (1998) **DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: modifications of DNA damage levels after a one-day field spraying period with selected pesticides**. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7:929-40
16. López-Carrillo L., Torres L., Waliszewsky S. and Saldade O. (1995) **Is DDT use a public health problem in México**. Environ. Health Perspect. 104: 584-588.
17. López- Carrillo L., Torres-Sánchez L., Wolf MS. et al. (2001) **Breast-Feeding and Serum p'p-DDT levels among Mexican women of childbearing Age: A pilot study**. Environ Res. 87:131-135.
18. Moller, P., Knudsen, LE, Loft, S, Wallin, H. (2000) **The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors**. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 10: 1005-1015
19. Pérez-Maldonado, IN, Díaz-Barriga, F., De la Fuente, H., González-Amaro, R., Calderón, J., and Yañez, L. (2004) **DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children**. Environ. Res. 94: 38-46.
20. Piperakis, SM., Petrakou, E., Tsilimigaki, S., Sagnou, M., Monogiudis, E., Haniotakis, G., Karkaseli, H., Sarikaki, E. (2003) **Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides**. Environ. Mol. Mutagen. 41:104-10.
21. Ramírez V, Cuenca P. (2002) **DNA damage in female workers exposed to pesticides in banana plantations at Limón, Costa Rica**. Rev. Biol. Trop. 50:507-18.
22. Sekihashi K, Yamamoto A, Matsumura Y, Ueno S, Watanabe-Akanuma M, Kassie F, Knasmuller S, tsuda S, Sasaki YF (2002) **Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay**. Mutat. Res. 517: 53-75

23. 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
24. Stapleton, F.H. (1998) **The dawn of DDT and its experimental use by the Rockefeller foundation in Mexico.** 1943-1952. Parasitologia 40: 149-158
25. Torres-Arreola L, López-Carrillo L, Torres-Sánchez L, Cebrian M, Rueda C, Reyes R, López-Cervantes, M. (1999) **Levels of dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) metabolites in maternal milk and their determinant factor.** Arch. Environ. Health 54: 124-129.
26. Undeger U, Basaran N. (2002) **Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay.** Arch. Toxicol. 76:430-6
27. Waliszewski S.M, Aguirre A.A, Infanzon R.M, Silva C.S, Siliceo J. (2001) **Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz.** Arch Environ Contam Toxicol 40: 432-438
28. Waliszewski S.M, Aguirre A.A, Infanzon R.M. (1999) **Levels of organochlorine pesticide residues in blood serum and umbilical blood serum of mothers living in Veracruz, México.** Fresenius Environ Bull 8: 171-178.
29. Wei Q, Lee J.E, Gershenwald J.E, Ross M.I, Mansfield P.F, Strom SS, Wang L.E, Guo Z, Qiao Y, Amos CI, Spitz MR, Duvic M. (2003) **Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma.** J Natl Cancer Inst; 95: 308-15.
30. Yáñez, L, Ortiz-Pérez., Batres, L.E., Borja-Aburto, V.H., Díaz-Barriga, F. (2002) **Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of México.** Environ. Res. 88: 174-81.
31. Yáñez L, Borja-Aburto V.H, Rojas E, De la Fuente H, González-Amaro R, Gómez H, Jongitud AA, Díaz-Barriga F. (2004) **DDT induces DNA damage in blood cells. Studies in vitro and in women chronically exposed to this insecticide.** Environ. Res. 94:18-24
32. Yáñez L, García-Nieto E, Rojas E, Carrizales L, Mejía J, Calderón J, Razo I, Díaz-Barriga F. (2003) **DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area.** Environ Res. 93:231-40.
33. Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. (2001) **Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides.** Mutagenesis. 16:359-63.

## ACCION INJURIANTE DEL ATAQUE DEL CHUCHO (*Chondrichthyes*, Fam. *Myliobatidae*). ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS TEGUMENTOS PRESENTES EN SU ESPINA

H. E. Christiansen(1) y M. B. Cousseau(2)

1. Investigador consulto del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo Nº 1, Escollera Norte (C.C. 175) 7600 Mar del Plata, Argentina.
2. Departamento de Ciencias Marinas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350. 7600 Mar del Plata. e-mail: mbcousse@mdp.edu.ar.

Autor al cual dirigir la correspondencia: Dra. María Berta Cousseau. Departamento de Ciencias Marinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNMDP). Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Fax: (0223) 475 3150. e-mail: mbcousse@mdp.edu.ar

**RESUMEN.** Christiansen H. E. y Cousseau M. B. **Acción injuriente del ataque del chucho (*Chondrichthyes*, Fam. *Myliobatidae*). Estudio histológico de los tegumentos presentes en su espina.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 17-19.* En el presente trabajo se describen las características del tegumento que cubre la espina y la parte dorsal de la cauda que forma el lecho de la misma, en dos especies de chucho: *Myliobatis goodei* y *Myliobatis sp.* Se hace referencia al epitelio, que se caracteriza por ser altamente descamante y contener glándulas unicelulares acidófilas que se considera presuntas sintetizadoras de la noxa.

**ABSTRACT.** Christiansen H. E. and Cousseau M. B. **Injurious action of the sting ray attack (*Chondrichthyes*, Fam. *Myliobatidae*). Histological study on the teguments of the sting rays spines.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 17-19.* The work deals with the characteristics of the teguments covering the spine and the dorsal part of the tail where the spine rest on, in two species of sting rays: *Myliobatis goodei* and *Myliobatis sp.* The epithelium is described, it is highly descamative and include acidophilic unicellular glands, considered as presumed venom secretants.

**Palabras clave:** tegumentos; chuchos; *Myliobatis spp*; secreción venenosa.  
**Key words:** teguments; sting rays; *Myliobatis spp*; venomous secretion.

### INTRODUCCION

Las heridas producidas en el hombre por estos peces marinos costeros son de interés desde el punto de vista médico porque tienen consecuencias dolorosas e inflamatorias, acompañadas de otras manifestaciones clínicas, tales como náuseas, taquicardia, aumento de temperatura corporal, etc. (Russell, 1953)<sup>1</sup>.

En los metazoarios, los tegumentos conjuntamente con su función de revestimiento y especializaciones sensoriales, adaptativamente adquieren además, la frecuente característica de estructurarse como *exomucosas*, diferenciándose como membranas secretantes descamativas que pueden transformarse en sistemas ofensivo y defensivo. Estas funciones, conspicuamente diferenciadas, se manifiestan en el epitelio tegumentario de las espinas de las dos especies de chucho observadas: *Myliobatis goodei* Garman, 1885 y *Myliobatis sp.*

Las personas dedicadas a la actividad pesquera, tanto comercial como deportiva, son aquellas principalmente expuestas a las lesiones producidas por las espinas de los chuchos. Estas lesiones pueden provocar las diversas manifestaciones clínicas citadas, de consecuencias raramente graves o mortales.

Se ha considerado de interés la realización de una primera descripción histológica de los tegumentos potencialmente causantes de las afecciones mencionadas, debido a que no había antecedentes al respecto ni sobre las especies seleccionadas ni sobre otras especies, en el área investigada.

### MATERIAL Y MÉTODOS

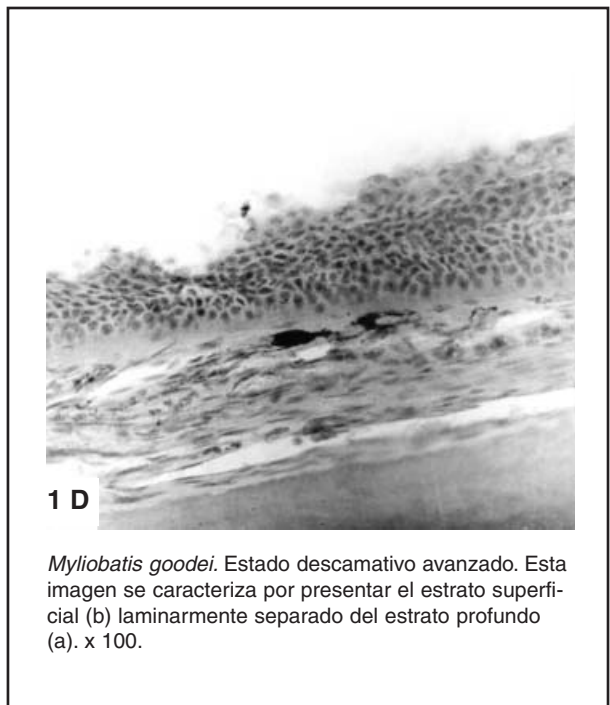
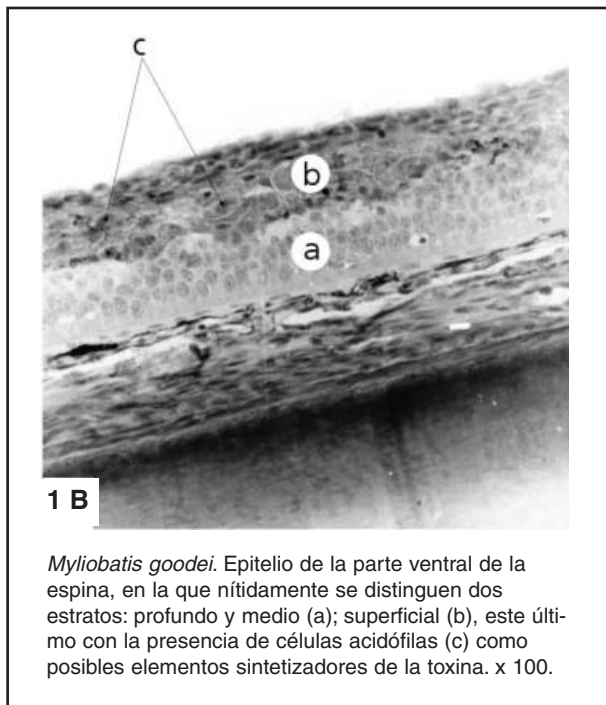
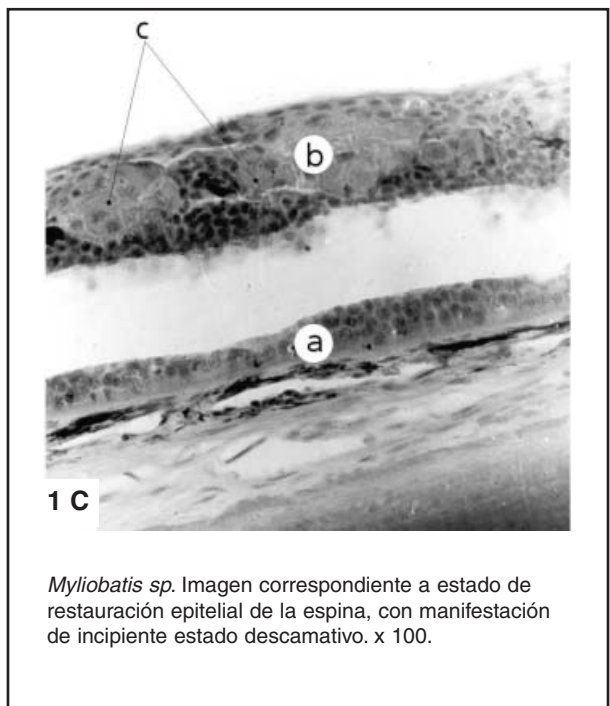
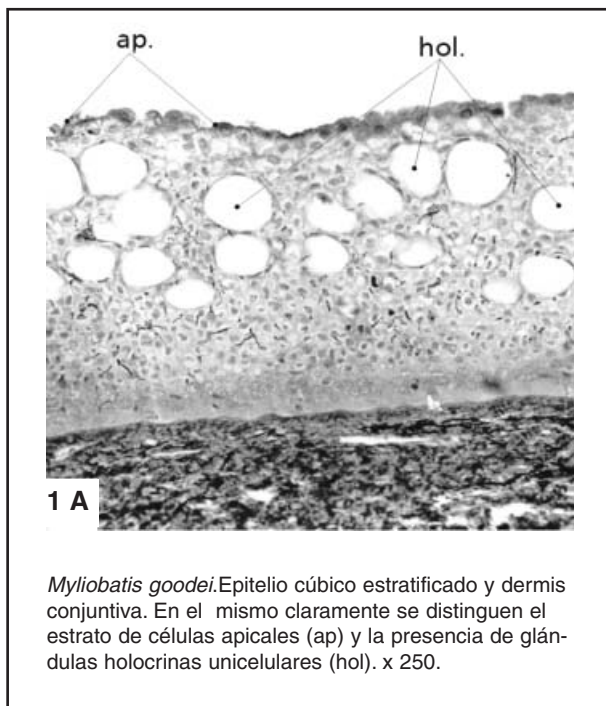
Para el estudio se han empleado 9 ejemplares de miliobátidos: 7 de *Myliobatis goodei* y 2 de *Myliobatis sp.*, 8 obtenidos en el mes de julio del 2001 y 1 en septiembre del 2004. Este último se analizó para comparar el tegumento vinculado a la espina con el de otras partes del cuerpo, de él se extrajeron, además de la región caudal, muestras de tegumento de las regiones dorsal y ventral. El primer lote de *Myliobatis goodei* estaba compuesto por 7 ejemplares adultos de entre 40 y 50 cm y un juvenil de 25 cm, el ejemplar correspondiente a septiembre del 2004 medía 48 cm. Los dos ejemplares de *Myliobatis sp.* eran adultos de 43 y 45 cm. Las medidas corresponden al ancho del disco. Las muestras provinieron de campañas llevadas a cabo con el Buque de Investigación del INIDEP "Dr. Eduardo L. Holmberg", en el área costera comprendida entre 34º y 38º S. En la mayoría de los casos la primera parte del trabajo se realizó a bordo, allí se seccionó la parte caudal, correspondiente a la región con la espina y se procedió a la fijación en formol al 10 %. Del ejemplar analizado con fines comparativos se tomaron las muestras en tierra. Todos los ejemplares fueron eliminados luego de obtenidas las muestras. En el laboratorio el material fue descalcificado mediante inmersión en solución de ácido nítrico al 5 % durante 5 días, pasándolo luego a solución de sulfato de sodio al 1% durante 24 horas. A continuación se procedió a la deshidratación, inclusión en parafina, cortes microtómicos de 5 mm y coloración con hematoxilina-floxina-eosina.

**RESULTADOS**

Los resultados comprenden dos aspectos: la descripción histológica de los epitelios secretantes y la dinámica involucrada en los procesos descamativos y en la restauración de las láminas epiteliales.

Descripción histológica del tegumento  
 En términos generales los epitelios tegumentarios de los miliobátidos observados son estratificados, en su mayor parte *cúbico estratificados*, con significativa presencia de glándulas unicelulares holocrinas (Fig. 1 A).

El revestimiento de la espina, en sus partes dorsal y ventral, no se aparta de esa tipificación pero se singulariza por su mayor espesor, principalmente en el lado ventral. Este último sector está constituido por una compleja formación mixta, de cobertura y de secreción, que se encuentra asentada sobre la robusta membrana basal de la dermis, formada por tejido conjuntivo denso. Entre las células de revestimiento, siempre dentro de la parte ventral, se encuentran numerosas formaciones unicelulares específicas, densamente agrupadas y de



significativa reacción acidófila, que se considera son las sintetizadoras de la toxina (Fig. 1 B).

No se han encontrado formaciones glandulares dérmicas como las mencionadas por Castex y Loza (1964)<sup>2</sup> para rayas de agua dulce del Género *Potamotrygon*.

En el ejemplar juvenil no estaban presentes ni las glándulas holocrinas ni las acidófilas, la trama tegumentaria era de características embrionarias. En el tegumento de las regiones dorsal y ventral del adulto analizado con fines comparativos había numerosas glándulas holocrinas pero no se observaron las acidófilas.

### Dinámica de las membranas secretantes

La trama epitelial de las especies del Género *Myliobatis* observadas, principalmente la correspondiente a la espina en su parte ventral, se puede considerar como una *exomucosa secretante* de población celular muy dinámica, altamente descamativa. En oposición a lo que ocurre en la mayoría de los epitelios de los vertebrados, la cohesión en este caso es prácticamente nula, lo que hace que se encuentren zonas de incipiente descamación (Fig. 1C), cuya imagen podría corresponder a la restauración epitelial que sucede a un proceso altamente descamativo, tal como lo que se evidencia en la Figura 1D, que guarda significativa analogía con las imágenes de la ecdisis de los reptiles.

### DISCUSION

Las lesiones más frecuentes son las que se registran en tobillo, pie y otras partes de los miembros inferiores que no exceptúan otras regiones del cuerpo, tales como las zonas hepática y cordial, estas últimas de graves consecuencias (Rifkin y Williamson, 1996)<sup>3</sup>.

La acción tóxica de estos animales es conocida desde hace mucho tiempo, en diversos lugares del mundo (Russell, 1953). Ya en 1931 y 1932 se había demostrado que los miliobátidos producen venenos, mediante investigaciones en la especie *Potamotrygon motoro* (Halstead, 1970)<sup>4</sup>. Estos trabajos han sido precedidos por otras investigaciones que datan de 1905, 1907; 1916, 1921, 1923 y 1924 (Halstead, 1970), todos ellos con pruebas mediante inoculación en animales experimentales. En Argentina, Castex (1963 a<sup>5</sup> y b<sup>6</sup>) y Castex y Loza (1964) han estudiado en profundidad la toxicología de rayas de agua dulce del Género *Potamotrygon*.

De los análisis efectuados se deduce que la acción venenosa e inflamatoria ha de circunscribirse a las exomucosas secretantes en las que se registra la presencia de las células acidófilas, complementadas con las características morfológicas y funcionales de la espina. Esta es una formación fibrocartilaginosa, de extremo agudo y bordes aserrados, que constituye un medio eficaz de punción y corte, a la vez que instrumento de dilaceración de tejidos, vasos sanguíneos y periostios. Por la herida así causada se infiltra el veneno, que unido a la desca-

mación de las membranas epiteliales, actúa como factor nocivo, antigénico y de actuación como cuerpo extraño, con las reacciones inflamatorias y de rechazo involucradas.

Con referencia a la composición química de la toxina, según Courbille (en Halstead, 1970) el ph es de 6,76, no tolera la liofilización, presenta un tenor de 30% de proteínas, 3% de N total y 3% de carbohidratos y presencia de serotonina 5-nucleotidasa, el peso molecular es de aproximadamente 100 000.

### Agradecimientos

Los autores agradecen en primer lugar al Dr. Luis O. Lucifora y al Sr. Jorge Colonello por la recolección del material; a los médicos Dres. Carlos Bertuzzi, Jorge J. Dietsch y Enrique G. Bertranou por la lectura crítica, las valiosas sugerencias y observaciones; a los miembros del INIDEP, Dr. Gustavo J. Macchi por las fotomicrografías y la Sra Marcela Tobío por la revelación de las mismas y al Sr. Gustavo Christiansen por el escaneado.

### BIBLIOGRAFIA

1. Russell, F.E. 1953. **Stingray injuries: a review and discussion of their treatment.** Amer. J. Med. Sci., 226: 611 – 622.
2. Castex, M.N. & Loza, F. 1964. **Etiología de la enfermedad paratrygónica.** Estudio anatómico, histológico y funcional de la raya fluvial americana (Gen. *Potamotrygon*). Rev. Asoc. Méd. Argent. 78 (6): 314 – 324.
3. Rifkin, J.F. & Williamson, J. A. 1996. **Venomous fish.** In: Williamson, J. A., Fenner, P.J., Burnett, J. W. & Rifkin, J.F. (Eds.). *Venomous and poisonous marine animals. A medical and biological handbook.* Chapter 16: 354 – 368. Univ. New Wales Press, Sydney, Australia.
4. Halstead, B.W. 1970. **Poisonous and venomous marine animals of the world.** Vol. III. Vertebrates: 1 – 83. Washington, D.C. US Government Printing Office. Library of Congress Cat. Nº 65 – 60000.
5. Castex, M. N. 1963a. **La raya fluvial. Notas histórico-geográficas.** Depto. Ciencias, Colegio Inmaculada Concepción, Santa Fe: 65 – 85.
6. Castex, M.N. 1963b. **Observaciones sobre la raya de río Potamotrygon motoro (Müller y Henle).** Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". Hidrobiología, I (2): 7 – 17.

## CONTENIDO DE PLOMO, CROMO Y CADMIO EN MOLUSCOS COMESTIBLES DEL GOLFO SAN JORGE (ARGENTINA)

Adriana Angela Pérez(1); María Angélica Fajardo(2); Analia Mabel Strobl(1); Laura Beatriz Pérez(3); Adriana Piñeiro(4); Clara Magdalena López(4).

1. Cátedra de Toxicología y Química Legal. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, ARGENTINA.
2. Cátedra de Bromatología y Nutrición Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, ARGENTINA.
3. Cátedra de Introducción a la Biología. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, ARGENTINA.
4. Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. ARGENTINA.

Autor al cual dirigir la correspondencia: Bioq. Adriana Perez, J.M Rodrigo N° 527. (9000) Comodoro Rivadavia. Chubut. Argentina. Tel.: ++54 - 297-4550339 Int 26. e-mail: aaperez@sinectis.com.ar

**RESUMEN.** Pérez A.; Fajardo M. A.; Strobl A. M.; Pérez L. B.; Piñeiro A.; López C.M. **Contenido de plomo, cromo y cadmio en moluscos comestibles del Golfo San Jorge (Argentina).** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 20-25.* En la costa patagónica argentina existe una gran variedad de moluscos bivalvos, entre ellos *Aulacomya ater* (cholga) y *Mytilus edulis platensis* (mejillón), que son recolectados como recurso alimentario.

El objetivo del trabajo fue cuantificar los niveles de plomo, cromo y cadmio en ambos bivalvos, como primera aproximación, para establecer la seguridad alimentaria cuando son consumidos por los seres humanos y evaluar el posible impacto toxicológico. Los metales se cuantificaron por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. Los niveles más altos (en peso seco) de cadmio (5,72 µg/g) y cromo (1,44 µg/g) se encontraron en mejillones recolectados en Punta Maqueda, lugar alejado de la actividad antropogénica, mientras que los niveles más elevados de plomo (0,42 µg/g), se hallaron en mejillones de la desembocadura del Arroyo La Mata, zona influenciada por actividad industrial y petrolera. Los valores de cadmio y plomo hallados no superan los valores propuestos como límites máximos por la Secretaría Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Se podría concluir que la concentración de plomo encontrada en moluscos del Golfo San Jorge no constituiría un problema desde el punto de vista de la salud pública. Sin embargo se han observado valores cercanos al ISTP (ingesta semanal tolerable provisional) para el cadmio.

**ABSTRACT.** Pérez A.; Fajardo M. A.; Strobl A. M.; Pérez L. B.; Piñeiro A.; López C.M. **Content of lead, chromium and cadmium in edible mussels of the Gulf San Jorge (Argentina).** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (1): 20-25.* In the Patagonian marine coast in Argentina there is a great variety of bivalves, among them *Aulacomya ater* (cholga) and *Mytilus edulis platensis* (mussel), which are collected as food resource.

The aim of the following work was to quantify the levels of lead, chromium and cadmium in these bivalves, in order to establish the food security when they are consumed by human beings and to evaluate a possible toxicology impact. The analyzed metals were determined by graphite furnace atomic absorption spectrophotometer. The highest levels (dry weight) of cadmium (5.72 µg/g) and chromium (1.44 µg/g) were found in mussels collected in Punta Maqueda, a place far away from anthropogenic activities, while the highest levels of lead (0.42 µg/g) were found in mussels found in the outlet of Arroyo La Mata; area which is influenced by industrial activities and oil companies. The rates of cadmium and lead do not overcome the values proposed as maximum limit by SENASA (National Secretary of Sanity and Agricultural Quality). In conclusion, we can say that the concentration of lead and chromium analyzed in mussels of the Gulf San Jorge does not reflect problems from the point of view of the public health. However it has been observed values near to the PTWI (Tolerable Provisional Weekly Intake) for cadmium.

**Palabras clave:** Bivalvos patagónicos, plomo, cadmio, cromo, ISTP.

**Key words:** Patagonian bivalves, lead, chromium, cadmium, PTWI.

### INTRODUCCIÓN

El mar es ampliamente utilizado por el hombre como fuente de alimentos pero también es el reservorio del vertido de desechos, hasta el punto de poner en peligro su capacidad para autodepurarse, y así poner en riesgo a los seres vivos que lo habitan y a los que se abastecen de él<sup>1</sup>.

El ser humano como consumidor ocupa distintos niveles tróficos en las cadenas alimentarias y, debido a procesos de bioacumulación y de biomagnificación, termina expuesto a concentraciones elevadas de agentes potencialmente tóxicos<sup>2</sup>.

Entre estos agentes están los metales pesados, como el plomo, el cromo y el cadmio, que además de constituir un grave problema medioambiental, pueden bioacumularse en distintos tipos de organismos marinos, como los moluscos bivalvos e incidir en la seguridad alimentaria del hombre.

El plomo es un elemento ubicuo<sup>3</sup> presente en casi

todas las fases del medio ambiente inerte y en todos los sistemas biológicos. La principal vía de entrada en la población humana, en general, es la alimentaria<sup>4,2</sup>. Prácticamente no existen alimentos sin plomo, los cuales resultan contaminados por distintos procesos<sup>2</sup>. A dosis tóxicas este metal actúa fundamentalmente en el sistema nervioso, el hemático y el renal, desarrollando como principales patologías, encefalopatías y/o neuropatía periféricas, anemia microcítica e hipocrómica y necrosis tubular, respectivamente<sup>2,3,4,5</sup>.

El cadmio que se absorbe en el organismo se fija rápida y selectivamente a los tejidos ricos en metalotioneínas, una proteína de bajo peso molecular con un elevado número de grupos sulfhidrilos pertenecientes al aminoácido cisteína<sup>6</sup>. La mayor parte de la carga total del cadmio en el organismo se localiza en el hígado y en los riñones. En las intoxicaciones crónicas aparece una patología



ósea descrita como una osteomalacia relacionada con el metabolismo del calcio (Itai-Itai)<sup>2</sup>.

El cromo puede presentarse en varias especies iónicas, de las cuales el Cr (III) y el Cr (VI) son las de mayor interés toxicológico. La especie trivalente es esencial para el metabolismo humano y los alimentos constituyen su principal fuente. A este elemento se le fijó una ingesta adecuada (IA) para hombres y mujeres de entre 19 y 50 años de 35 y 25 µg/día, respectivamente<sup>7,8</sup>. Si bien es cierto que no se han establecido aún ingestas máximas tolerables (IMT), se sabe que este micronutriente produce efectos tóxicos a largo plazo cuando se consume crónicamente en cantidades elevadas<sup>7</sup>.

El cromo hexavalente es más tóxico que el cromo trivalente, se absorbe fácilmente a través de las membranas celulares y a nivel del retículo endoplásmico se reduce a cromo (III)<sup>8</sup>.

En el litoral marino patagónico argentino existe una gran variedad y cantidad de moluscos bivalvos. En términos ecológicos y alimentarios los más importantes son *Aulacomya ater* conocida como cholga y *Mytilus edulis platensis*, vulgarmente llamado mejillón. Sus comunidades tapizan grandes áreas del fondo y del litoral rocoso<sup>9</sup>. Por su elevado valor comercial y por ser importantes en la dieta de determinados grupos sociales, su recolección es una actividad importante sobre la que se basa el desarrollo socioeconómico de numerosas poblaciones de las costas patagónicas.

Esta actividad de costa fue declarada de interés provincial por la Honorable Legislatura de la Provincia del Chubut en 1992<sup>10</sup>. Sin embargo, el fenómeno de bioacumulación en estos organismos y la biomagnificación a través de la cadena alimentaria, constituye un serio riesgo para los grandes predadores y, por consiguiente, un riesgo potencial para la salud humana<sup>11</sup>.

Por ello el objetivo del siguiente trabajo es cuantificar los niveles de plomo, cromo y cadmio en *Aulacomya ater* y *Mytilus edulis platensis* en dos sitios del Golfo San Jorge, Argentina, como una primera aproximación para establecer la seguridad alimentaria cuando son consumidos por humanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Zona de muestreo

Los ejemplares de *Aulacomya ater* y *Mytilus edulis platensis* fueron recolectados manualmente del infralitoral marítimo, durante el invierno del año 2000 en dos zonas del Golfo San Jorge (Figura 1):

**a.** Desembocadura del Arroyo La Mata, lugar elegido por su proximidad a la ciudad de Comodoro Rivadavia y por recibir desechos de la actividad industrial y petrolera.

**b.** Punta Maqueda, ubicada a 30 km al sur de Comodoro Rivadavia a 46 L.S., 67 L.O., (Provincia de Santa Cruz). Esta zona está alejada de la actividad antropogénica.

### Muestreo y tratamiento de las muestras

Los muestreos fueron efectuados simultáneamen-



Figura 1. Mapa del Golfo San Jorge indicando los lugares de muestreo (desembocadura del Arroyo La Mata y Punta Maqueda)



Punta Maqueda.



Desembocadura del Arroyo La Mata.

te en los dos lugares elegidos. En cada una de las zonas se recolectaron aproximadamente 70 organismos de tamaño similar (40 a 60 mm), para minimizar las diferencias en la acumulación de metales debidas a la edad, el tamaño y la variación en la velocidad de filtración<sup>12</sup>.

Los organismos fueron recolectados a un mismo nivel de marea para evitar la variación en la concentración de metales debida a diferencias fisiológicas causadas por los diferentes grados de exposición al aire<sup>13</sup>. Fueron desprendidos del sustrato con bisturí, luego fueron guardados en bolsas de polietileno limpias y transportados refrigerados al laboratorio para su posterior análisis.

La población de la zona generalmente no realiza la depuración de los organismos que recoge para el consumo, por lo tanto, en este trabajo no se realizó

ese tratamiento para evitar variaciones en la concentración de los metales.

En el laboratorio los bivalvos se lavaron con agua potable y posteriormente con agua destilada para remover la arena y la epibiota. Con un bisturí se separaron las valvas de la masa visceral y se secaron en estufa (50°C) por 24 horas y se conservaron a -20°C, hasta el momento de su procesamiento. De todos los bivalvos recolectados se eligieron al azar siete organismos de cada especie (siete unidades muestrales) los cuales fueron procesados individualmente.

Todo el material de vidrio utilizado fue previamente descontaminado con HNO<sub>3</sub> al 50% v/v durante 24 horas y sometidos a seis enjuagues con agua desionizada<sup>14</sup>.

### Digestión por microondas

Para realizar la mineralización se descongelaron las muestras, se molieron en morteros y se las llevó a peso constante en estufa a 100°C. Se pesaron exactamente alrededor de 200 mg de muestra seca de cada unidad muestral, luego se colocaron en vasos de teflón y se agregaron 4 ml de HNO<sub>3</sub> (J.T. Baker ACS).

Se colocaron en bombas Parr<sup>5</sup>, que fueron llevadas a un microondas para su digestión, a una potencia de 1.200 watts durante 1 minuto para luego realizar la cuantificación de los metales.

### Análisis de plomo, cromo y cadmio

El análisis de los metales en las muestras mineralizadas se efectuó con un espectrofotómetro de absorción atómica Varian AA 840, equipado con horno de grafito GTA 100 y con inyector automático.

Las condiciones de atomización fueron las siguientes: longitud de onda para el plomo 283,3 nm, para el cromo 357,9 nm y para el cadmio 228,8 nm, con abertura de rendija ("slit") de 0,5 (Pb, Cd) y de 0,2 (Cr). El volumen de inyección fue de 30 ml.

### Análisis estadístico de los resultados

Para determinar las diferencias estadísticas de las concentraciones obtenidas se utilizaron los métodos de Kruskal y Wallis y Dunn's de comparación múltiple<sup>16</sup>. Para el análisis se utilizó el programa estadístico INSTAT v 2.02, considerando las diferencias significativas al nivel  $p < 0,05$ .

### Control de calidad del método analítico

El control de calidad del método analítico fue realizado mediante el uso de material certificado de referencia BCR 279 (Sea lettuce). La tabla 1 muestra los resultados de los estudios de calidad.

### RESULTADOS

Del análisis de las muestras de bivalvos analiza-

**Tabla 1.** Concentración de Cd, Cr y Pb en material certificado (BCR 279, Sea lettuce)

Elemento	Nº de pruebas	Concentración certificada (µg/g)	Concentración obtenida (µg/g) $\bar{x} \pm DE$
Cd	10	0,274	0,254 ± 0,01
Cr	10	10,7	11,06 ± 0,5
Pb	10	13,48	12,80 ± 0,7(*)

**Tabla 2.** Concentraciones de Pb, Cr y Cd (µg/g ps) en *Aulacomya ater* (n=7) en Punta Maqueda y desembocadura del Arroyo La Mata

	Punta Maqueda		Arroyo La Mata	
	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx
Pb	0,31 <sup>a</sup> ± 0,20	0,10 - 0,58	0,36 <sup>a</sup> ± 0,24	0,02 - 0,24
Cr	1,16 <sup>a</sup> ± 0,19	1,38 - 1,84	1,24 <sup>a</sup> ± 0,47	0,77 - 2,12
Cd	4,02 <sup>a</sup> ± 2,15	3,42 - 7,49	3,06 <sup>a</sup> ± 0,87	2,20 - 4,37

DE: desviación estándar. ps: peso seco  
Superíndices iguales en la misma fila indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ )

**Tabla 3.** Concentraciones de Pb, Cr y Cd (µg/g ps) en *Mytilus edulis platensis* (n=7) en Punta Maqueda y desembocadura del Arroyo La Mata

	Punta Maqueda		Arroyo La Mata	
	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx
Pb	0,21 <sup>a</sup> ± 0,15	0,04 - 0,44	0,42 <sup>b</sup> ± 0,26	0,02 - 0,77
Cr	1,44 <sup>a</sup> ± 0,27	0,93 - 1,82	0,85 <sup>b</sup> ± 0,29	0,27 - 1,08
Cd	5,72 <sup>a</sup> ± 3,11	3,31 - 9,72	1,95 <sup>b</sup> ± 0,27	1,50 - 2,21

Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

das en dos zonas del Golfo San Jorge surgen los siguientes resultados:

En la tabla 2 se pueden observar las concentraciones de plomo, cromo y cadmio encontradas en *Aulacomya ater* (cholga) expresadas en µg por gramo de muestra en peso seco (µg/g ps) en las dos zonas de muestreo: Punta Maqueda y desembocadura del Arroyo La Mata.

En las dos localidades estudiadas, las concentraciones de cadmio en estos bivalvos fueron más altas que las correspondientes a las del cromo y plomo. Al comparar las concentraciones de cada metal entre las dos zonas de muestreo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

En la tabla 3 se pueden observar las concentra-

**Tabla 4.** Concentraciones promedio de Pb, Cr y Cd en *Mytilus sp* en diferentes estudios ( $\mu\text{g/g ps}$ )

Pb $\bar{x}$	Cr $\bar{x}$	Cd $\bar{x}$	Lugares
8,64	5,37	0,66	Ría de Pontevedra, España <sup>18</sup>
1,60	-	2,00	Mar de Barent, Ártico <sup>19</sup>
2,50	1,20	1,50	Ría Formosa, Portugal <sup>17</sup>
-	-	5,25	Baja California, México <sup>13</sup>
0,42	0,85	1,95	Arroyo la Mata, Argentina
0,21	1,44	5,72	Punta Maqueda, Argentina

ciones de plomo, cromo y cadmio encontradas en *Mytilus edulis platensis*, donde se aprecia que los valores de cadmio fueron más elevados que los de cromo y plomo.

Las concentraciones de los tres metales fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre las dos zonas de muestreo. Los valores promedio de plomo fueron más elevados (100%) en los especímenes recolectados en la desembocadura del Arroyo La Mata, mientras que las concentraciones promedio de cadmio y cromo fueron mayores en Punta Maqueda (193% y 69% respectivamente).

## DISCUSIÓN

Las concentraciones promedio de cadmio en *Aulacomya ater* (cholga) recolectadas en Punta Maqueda (4,02  $\mu\text{g/g ps}$ ) y en la desembocadura del Arroyo La Mata (3,06  $\mu\text{g/g ps}$ ) fueron del mismo orden que las encontradas por Gil *et al*<sup>11</sup> en otros lugares de la costa patagónica. Estos autores reportaron en Bahía Camarones un promedio de 6,33  $\mu\text{g/g ps}$ , en Puerto Madryn de 4,43  $\mu\text{g/g ps}$  y en la zona de Bahía Nueva de 5,3  $\mu\text{g/g ps}$ . Sin embargo los niveles promedio de plomo encontrados por ellos en Faro Aristizabal y en Bahía Camarones (5,24 y 6,85  $\mu\text{g/g ps}$ , respectivamente) fueron más elevados en comparación con los reportados en este trabajo en Punta Maqueda (0,31  $\mu\text{g/g ps}$ ) y en la desembocadura del Arroyo La Mata (0,36  $\mu\text{g/g ps}$ ). En *Mytilus edulis*, la concentración de cadmio y cromo en Punta Maqueda fue mayor que la encontrada en Arroyo la Mata, a pesar de que esta última zona recibe efluentes de la actividad industrial y petrolera. Similar comportamiento fue descrito por Gutiérrez-Galindo *et al*<sup>13</sup> en Baja California (México) donde reportaron rangos de concentración de cadmio mayores en lugares "aparentemente limpios" (1,37 a 5,25  $\mu\text{g/g ps}$ ) comparados con aquellos lugares contaminados con descargas de aguas residuales (0,60-2,13  $\mu\text{g/g ps}$ )<sup>13</sup>. Estos autores atribuyeron la diferencia a un fenómeno físico como las surgencias, mientras que en nuestras costas se explicaría por la dinámica marina que traslada los sedimentos con distintas cargas de metales

a través de las corrientes litorales.

Al comparar los niveles de metales hallados en *M. Edulis* con los reportados en otros lugares del mundo (tabla 4) se observa que las concentraciones de plomo tanto en Punta Maqueda como en la desembocadura del Arroyo La Mata son inferiores a las allí reportadas.

Las concentraciones de cadmio halladas en ambos puntos de muestreo fueron superiores a las encontradas en la Ría de Pontevedra (España) mientras que fueron similares a las de los otros sitios.

Los valores de cromo hallados en la desembocadura del Arroyo La Mata fueron menores que los hallados en

la Ría de Pontevedra y Formosa mientras que los encontrados en Punta Maqueda resultaron ser superiores a las de la Ría Formosa e inferior a los de Pontevedra.

Los moluscos, para que puedan ser considerados aptos para el consumo humano, deben cumplir con requisitos desde el punto de vista nutricional, psicosensorial e higiénico-sanitario. Este último aspecto incluye el estudio microbiológico y toxicológico. La determinación de elementos traza potencialmente tóxicos en los alimentos ha adquirido un creciente interés. Ello determina que los países posean legislaciones que fijan los máximos permitidos. Es así como la Argentina ha legislado en dicha materia a través del Código Alimentario Argentino (CAA) y otras legislaciones.

La Resolución MERCOSUR N° 102/94 sobre contaminantes inorgánicos incorporada al (CAA) establece para pescado y sus derivados un límite máximo para el cadmio de 1  $\mu\text{g/g}$  y para el plomo de 2  $\mu\text{g/g}$  en peso fresco (equivalente aproximadamente a 5 y 10  $\mu\text{g/g}$  de peso seco). Sin embargo, no especifica el límite tolerable para moluscos bivalvos<sup>20</sup>. Por su parte, la Secretaría Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) establece específicamente para los bivalvos un límite máximo de cadmio y de plomo de 2  $\mu\text{g/g}$  en peso húmedo (10  $\mu\text{g/g ps}$ )<sup>21</sup>.

La Comunidad Económica Europea establece límites máximos para el cadmio y plomo de 1  $\mu\text{g/g}$  y 1,5  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo respectivamente (equivalente a 5 y 7,5  $\mu\text{g/g}$  de peso seco)<sup>22</sup>.

La Ordenanza Municipal de los Servicios de la Salud Pública de Hong Kong (PHMSO) establece máximos permitidos en alimentos marinos de cadmio, plomo y cromo de 2, 6 y 1  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo equivalente a 10, 30 y 5  $\mu\text{g/g}$  en peso seco<sup>23</sup>. El JECFA (Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)<sup>24</sup> establece una ingesta semanal tolerable provisoria (ISTP) de 7  $\mu\text{g/kg/semana}$  de cadmio y de 25  $\mu\text{g/kg/semana}$  de plomo.

Si se comparan las concentraciones de los metales en los bivalvos estudiados con las establecidas en las diferentes legislaciones se observa que pa-

ra la SENASA serían aptos para el consumo humano, mientras que si se aplicaran los máximos permitidos por las resoluciones del MERCOSUR y por las de la Comunidad Económica Europea estos moluscos no podrían ser consumidos ya que exceden los límites establecidos para el cadmio. En las costas patagónicas estudiadas existen pobladores que utilizan los moluscos como principal fuente de alimento. Los datos aportados por este estudio son indicativos de que moluscos provenientes de la zona de Punta Maqueda deberían ser consumidos con precaución dado que con el consumo de 368 g/semana (aproximadamente 76 unidades) un sujeto de 60 kilogramos de peso corpóreo alcanzaría el valor de ISPT fijado por el JECFA para el cadmio.

No ocurre lo mismo con el plomo puesto que los valores hallados fueron bajos y se encuentran dentro de los límites establecidos por las distintas legislaciones. Así, para alcanzar el ISPT fijado por el Comité FAO/OMS un sujeto de 60 kilogramos de peso corporal debería consumir una cantidad exorbitante de bivalvos (aproximadamente 50 kg). Con respecto al cromo, ni SENASA ni el CAA establecen límites máximos tolerados para este metal en los alimentos de origen marino ni tampoco se ha establecido una ISPT.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se concluye que las concentraciones de plomo halladas en moluscos recolectados en Punta Maqueda y en la desembocadura del Arroyo La Mata (Golfo San Jorge) no representarían problema alguno desde el punto de vista de la salud pública. Idéntica consideración puede formularse con respecto al cromo si se tiene en cuenta lo prescripto por la legislación de Hong Kong. En el caso del cadmio, el consumo de los moluscos recolectados en los sitios estudiados debería realizarse con moderación ya que con pocas unidades ingeridas se alcanzaría el valor límite del ISPT.

Es de destacar que existen discrepancias entre las diferentes legislaciones referentes a los niveles máximos permitidos de cadmio y plomo en los alimentos de origen marino, por lo que sería recomendable estandarizar estos valores e incorporar máximos permitidos para el cromo.

A partir de este estudio surge la necesidad de continuar con el monitoreo de estos metales en distintas especies de moluscos comestibles de la región patagónica para establecer lugares óptimos para la maricultura, actividad productiva que se está promocionando desde la Secretaría de Pesca de la Provincia del Chubut.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Marcelo Conti por donar material certificado para la realización de este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Galvão, L.; Corey, G. (1987). Centro Panamericano de Biología Humana y Salud Organización Panamericana de la Salud; Serie vigilancia 4, Metepec (México), 26-28.
- Roses, O.E. (1995). **Metales**. En *Toxicología de los alimentos* Silvestre AA editores. Editorial: Hemisferio Sur, Buenos Aires (Argentina), 281-286.
- Boudone, C.I. (1982). **Toxicidad de los metales**. En: *Toxicología y Seguridad de los Alimentos*. Editor: Derache, R. Barcelona. Editorial Omega 8:136-161.
- Goyer, R.; Clarkson, T.W. (2001). "**Toxic Effects of metals**". En "Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons". 6<sup>th</sup> ed. Editor: Klaassen, C.D. N. York. Mc Graw Hill, 811-868.
- Lindner, E. (1995). **Intoxicaciones a causa de la preparación inadecuada o alteración de los alimentos**. En *Toxicología de los alimentos*. Editorial Acibria. Zaragoza (España), 2:164-166.
- Lopez, A.M.; Repetto, M. (1995). **Estado Actual de la Toxicología del Cadmio**. En *Toxicología Avanzada*. Editorial Días Santo. Editor Repetto M. Madrid (España), 10: 393-424.
- Galvão, L.; Corey, G. (1987) Centro Panamericano de Biología Humana y Salud Organización Panamericana de la Salud; Serie vigilancia 5. Metepec (México), 25-26.
- National Academy of Sciences "**Dietary reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc**. 2001." Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine, Washington, D.C.
- Forcelli, D.O. (2000). **Moluscos Magallánicos**. Guía de los moluscos de la Patagonia y del sur de Chile. Editorial Vásquez Manzini. Buenos Aires (Argentina). 148-150.
- Berón, J. C. (1999). **Relevamiento de pesca artesanal en Chubut**. Rev. Naturalia Patagónica. Reportes técnicos. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. 2: 4-8. ISSN N° 0327-9510.
- Gil, M.; Harvey, M. A.; Bandoménico, H.; García, S.; Commendatore, M.; Gandini, P.; Frere, E.; Yorio, P.; Crespo, E.; Estévez, J.L. (1997). **Contaminación por metales y plaguicidas organoclorados en organismos marinos de la Zona Costera Patagónica**. Informes Técnicos del Plan del manejo Integrado de la zona Costera Patagónica. Informe N°: 32:1-15. ISSN N° 0328 -462X
- Boyden, C.R. (1977). **Effect of the size upon metal content of shellfish**. J. Mar. Biol. Assoc. 57: 675-714.
- Gutierrez - Galindo, E.A.; Muñoz-Barbosa, A. (2001). **Variabilidad Temporal de corto período de Ag, Cd, y Cu en Mytilus y la efectividad de este organismo como biomonitor**. *Ciencia Marinas*. 27(2): 269-288.
- Encina F, M.; Chuecas L., M.; Díaz O., S. (1995). **Metodología analítica base para la determinación de metales pesados en macroalgas**. En *Manual de Métodos Ficológicos*. Editores Alvear, Ferrario, Oliveira, Sar, Concepción (Chile). 763-765
- Sapp, R.E.; Davidson, S.D. (1991). **Microwave digestion of multi-component foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry**. J Food Science 56 (5): 1412-1414.
- Dawson-Saunders, B. and Trapp, R. (1994). **Bioestadística médica**. 1ra ed. Editorial El Manual Moderno. México.
- Corteseo, C.; Mendes, R.; Vale, C. (1986). **Metais pesados em bivalves e sedimentos na Ria Formosa**. Algarbe. Bol Inst Nac Invest Pescas Jan-Dez; 14: 3-28.

18. Ricardo, B.; Fernández, N.; Pombar, L. (2002). **Metal accumulation in wild intertidal mussels from Galician Rías**. En *Moluscan Shellfish Safety*. Editores Antonio Villalba, Beatriz Reguera, Jesus L Romalde, y Ricardo Beiras. 1ra ed. Santiago de Compostela (España)521-530.

19. Zauke, G.P.; Clason, B.; Savinov, V.M.; Savinova, T. **Heavy Metals of Inshore Benthic Invertebrates from the Barents Sea**. *The Science of the total Enviromen* (In press).

20. Código Alimentario Argentino: Anexo Mercosur. "E-287-289". (2000). Resolución Mercosur sobre contaminantes inorgánicos. Res N° 102/94. De La Canal y Asociados SRL. Buenos Aires.

21. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) (2000). Resolución 506/2000, numerales 23.24.28.

22. Anon (2002). Reglamento (CE) N° 221/2002 de la Comisión por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario oficial de las Comunidades Europeas, L37 .4-6.

23. Fang, Z. Q., Cheung, R. H.; Wong, M.H. (2001). **Heavy metal concentrations in edible bivalves and gastropods available in major markets of Pearl River Delta**. *J. Environ. Sci.* 13(2):210-217.

24. FAO/WHO (2000). **Summary of Evaluation of Performed by the Joint Expert Committee on Food Additives**. Geneva.

## INDICES - INDEXES / VOLUMEN 12 (2004)

### AUTORES - AUTHORS

ALAGÓN, A. ....	29	EZPELETA, D.C. ....	15, 63
CARBALLO, M.A. ....	2, 42	FERRARI, S.G. ....	19, 60
CURCI, O.H. ....	29, 42, 59	GADANO, A. ....	2
DE ROODT, A.R. ....	29, 39, 41	GARCIA, S.I. ....	29, 49, 56
DOLAB, J.A. ....	29	GOMEZ, C. M. ....	29
ESTEVEZ, J. ....	29	GOULD, E. G. ....	29
EVANGELISTA, M. ....	15, 53	PANIAGUA-SOLÍS, J. F. ....	29

### INDICE TEMATICO - SUBJECTS INDEX

Algarrobo blanco .....	3	Algarrobo blanco .....	3
Antitoxinas, uso terapéutico .....	29	Antitoxins, therapeutic use .....	29
Antivenenos, uso terapéutico .....	29	Antivenoms, therapeutic use .....	29
Bromadiolone, cuantificación de .....	9	Brofadicum, determination of .....	9
Brofadicum, cuantificación de .....	9	Bromadiolone, determination of .....	9
Cadmio, captación de .....	19	cadmium, absorption of .....	19
Canchalagua .....	2	Canchalagua .....	2
Cianobacteria .....	19	Comet assay .....	2
Difenacoum, cuantificación de .....	9	Cyanobacteria .....	19
Editorial .....	1	Difenacoum, determination of .....	9
Ensayo del cometa .....	2	Editorial .....	1
Espino colorado .....	2	Espino colorado .....	2
Hierbas medicinales .....	2	Genotoxic screening .....	2
Hiperamoniemia .....	15	Hyperammonemia .....	15
Jugos de fruta semi-sintéticos, neurotoxicidad ..	15	Medicinal herbs .....	2
Medicina tradicional .....	2	Molle de beber .....	2
Molle de beber .....	2	Nostoc minutum .....	19
Nostoc minutum .....	19	Paico .....	2
Paico .....	2	Sofora .....	2
Screening genotóxico .....	2	Superwarfarins .....	9
Sofora .....	3	Synthetic fruit juices, neurotoxicity .....	15
Superwarfarínicos .....	9	Traditional medicine .....	2
XIV Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, resúmenes de conferencias y mesas redondas		XIV Interdisciplinary Meeting of Toxicology, abstracts from posters	
XIV Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, resúmenes de pósters .....	42	XIV Interdisciplinary Meeting of Toxicology, abstracts from conferences and symposia .....	42

## 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 arábica 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.: "Castañé et al. (5) fueron los primeros en..."

Las referencias bibliográficas serán agrupadas bajo el acápite "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. Hidrobio. 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 readership 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 part 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 researchers 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. Bashamohideen (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 thereof 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 em 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 adotarão como referencia 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, no caso 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 corresponda, 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 "Bibliografia 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. Hydrobio. 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.