

# *Acta Toxicológica Argentina*

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Volumen 13  
N° 2  
Diciembre 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

Edda C. Villaamil Lepori

#### Vicepresidente

Susana I. García

#### Secretario

Gerardo D. Castro

#### Tesorera

Sandra O. Demichelis

#### Vocales

Gabriela Fiorenza

Cristina Rubio

Mirta Ryczel

#### Vocales Suplentes

Ricardo Aristu

Liliana Bulacio

María del Carmen Villarruel

#### Organo de Ficalización

#### Titulares

María del Carmen Magariños

Adriana Ridolfi

Daniel González (suplente)

#### Comité Científico

Marta A. Carballo

José A. Castro

Oswaldo H. Curci

Ricardo Duffard

Aldo S. Saracco

#### Tribunal de Honor

Carlos García

Estela Giménez

María Rosa Llorens

### Acta Toxicológica Argentina

#### Director

Ricardo Duffard *LATOEX, FBIOyF-UNR*

#### 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*

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*

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)*

|  |    |
|--|----|
| DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS CARBAMATOS EM ALIMENTOS<br>INFANTIS UTILIZANDO BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS À BASE DE ENZIMAS<br>ACETILCOLINESTERASES MUTANTES<br><i>DETERMINATION OF CARBAMATE INSECTICIDE RESIDUES IN BABY FOOD BY USING<br/>AMPEROMETRIC BIOSENSORS BASED ON MUTANT ACETHYLCHOLINESTERASE<br/>ENZYMES</i><br><i>Silva Nunes G.; Oliveira Marques C. V.; Castillo A.; Badea M.; Marty J. ....</i> | 1  |
| SPHINGANINE/SPHINGOSINE (SA/SO) RATIO AND INTAKE OF FUMONISIN<br>CONTAMINATED TORTILLAS IN A MEXICAN POPULATION<br><i>RELACIÓN ESFINGANINA/ESFINGOSINA (SA/SO) Y CONSUMO DE TORTILLAS<br/>CONTAMINADAS CON FUMONISINAS EN UNA POBLACIÓN MEXICANA</i><br><i>Landeros, P.; Reyes W.; Torres A. M.; Rojo F.; Chulze S. N. ....</i>  | 8  |
| JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA<br>Resúmenes de Conferencias, Mesas redondas y Comunicaciones libres<br><i>Abstracts of conferences, Symposia and poster presentations</i> .....   | 12 |
| VI CONGRESO LATINOAMERICANO DE MUTAGENESIS, CARCINOGENESIS<br>Y TERATOGENESIS AMBIENTAL<br>XIV CONGRESO ARGENTINO DE TOXICOLOGIA<br>XXIV JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE TOXICOLOGIA .....   | 25 |

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

## DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS CARBAMATOS EM ALIMENTOS INFANTIS UTILIZANDO BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS À BASE DE ENZIMAS ACETILCOLINESTERASES MUTANTES

Gilvanda Silva Nunes (1)\*, Clara Virginia Vieira Carvalho Oliveira Marques (1), Alicia Castillo (2), Mihaela Badea (3) & Jean-Louis Marty (4)

- (1) Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas, NARP, Departamento de Tecnologia Química, CCET, Universidade Federal do Maranhão - Av. Portugueses, s/n - Bacanga. 65080-040, São Luís, MA.  
(2) Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Sgto. Cabral, 2131, 3400 - Corrientes, Argentina.  
(3) Faculty of Medicine - Transilvania University of Brasov - 56, Nicolae Balcescu St., 2200, Brasov, Romania.  
(4) BIOMEM Laboratoire, Centre de Phytopharmacie, Université de Perpignan - 52, Av. Paul Alduy. 66860, Perpignan, Franca  
\* Autor correspondente: vandasn@terra.com.br

**ABSTRACT.** Silva Nunes G.; Oliveira Marques C. V.; Castillo A.; Badea M.; Marty J. **Determination of carbamate insecticide residues in baby food by using amperometric biosensors based on mutant Acetylcholinesterase enzymes.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (2): 1-7.* N-methylcarbamates (NMCs) are one of the most employed insecticide classes because of their low persistence and moderate toxicity for warm-blooded living organisms. However, their presence in food can affect seriously the human health, mainly kids whose defense systems are less mature against toxic chemicals. In this work, residues of some NMCs were detected in infant formula by employing a conventional HPLC/UV method and also by using an acetylcholinesterase (AChE)-based biosensor. The biosensor was based on screen-printed electrodes containing the electronic mediator 7,7,8,8-tetracyanoquino-dimethane (TCNQ) and the NMC-sensitive genetically modified AChE (from *Drosophila melanogaster*) immobilized on a polymeric matrix formed by poly(vinyl alcohol) bearing styrylpyridinium groups (PVA-SbQ). Inhibition constants for the NMCs were also calculated and the relative enzyme inhibition was proportional to the pesticide content in the samples. Residues of NMCs (carbaryl and aldicarb) were extracted from spiked samples by a miniaturized SPE method, and the resulting extracts were analyzed by both methods. For biosensor analysis, the extract was 10-fold concentrated with N<sub>2</sub> steam before dilution with phosphate buffer. Recoveries varied from 80 to 85% (RSD: 5-12%) and from 56 to 91% (RSD: 6-26%), for HPLC and AChE-biosensor, respectively. For carbaryl insecticide, a good correlation was observed between HPLC and biosensor methods. This work has demonstrated the interesting potential of AChE-biosensors that may enormously improve the detection limit of anti-cholinesterase pesticides and also be used for toxicological evaluations.

**RESUMEN.** Silva Nunes G.; Oliveira Marques C. V.; Castillo A.; Badea M.; Marty J. **Determinación de residuos de insecticidas carbamatos en alimentos de bebés utilizando biosensores amperométricos basados en enzimas acetilcolinesterasas mutantes.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (2): 1-7.* Los N-metilcarbamatos (NMCs) son algunos de los insecticidas más empleados debido a su baja persistencia y moderada toxicidad para los organismos de sangre caliente. Sin embargo, su presencia en los alimentos puede afectar seriamente la salud humana, especialmente en los niños, por sus defensas bajas para los productos tóxicos. En este trabajo, residuos de algunos NMCs han sido detectados en alimentos para bebés usando HPLC/UV y un biosensor basado en la enzima acetilcolinesterasa (AChE). El biosensor fue del tipo de electrodos serigrafados, conteniendo el mediador electrónico 7,7,8,8-tetracianoquinometano (TCNQ) y la enzima AChE mutante (*Drosophila melanogaster*), sensible a los NMCs y inmovilizada sobre una matriz polimérica formada por alcohol polivinílico, unidas a grupos estirilpiridínicos (PVA-SbO). Las constantes de inhibición para los NMCs fueron también calculadas, y la inhibición relativa de la enzima fue proporcional al contenido de los pesticidas en las muestras. Los residuos de los NMCs (carbaril y aldicarb) fueron extraídos de las muestras usando un método SPE miniaturizado y los extractos finales, analizados por ambos métodos. Para la determinación con biosensor, el extracto, concentrado 10 veces con N<sub>2</sub>, fue diluido con tampón fosfato. Las recuperaciones variaron del 80 al 85% (RSD: 5-12%) y del 56 al 91% (RSD: 6-26%), para HPLC y AChE-biosensor, respectivamente. Se observó una buena correlación para carbaril entre ambos métodos. Este trabajo destacó el interesante potencial analítico que tienen los AChE-biosensores, ya que los mismos pueden ampliar enormemente el límite de detección de los pesticidas anti-cholinesterasas y también ser usados en evaluaciones toxicológicas.

**Keywords:** carbamate insecticides; amperometric biosensor; baby food.

**Palavras-clave:** carbamatos; biosensor amperométrico; alimentos de bebés.

**Palavras-chave:** inseticidas carbamatos; biossensor amperométrico; alimentos infantis.

### INTRODUÇÃO

A principal estratégia no combate e prevenção de pragas agrícolas tem sido ainda o intenso uso de pesticidas<sup>1</sup>. Durante a última década, a quantidade e variedade de pesticidas aplicados em frutas e vegetais aumentou verticalmente. Entre os alimentos propensos a se encontrarem resíduos de pesticidas encontram-se as formulações infantis, nas quais o próprio processo de fabricação contribui para a concentração desses resíduos. Com o intuito de monitorar eventuais resíduos de pesticidas no ambiente e em alimentos, métodos analíticos têm sido desenvolvidos, e tais métodos são baseados em técnicas cromatográficas, em geral

caras e demoradas.

Os carbamatos compreendem uma importante classe de pesticidas, notadamente devido à sua baixa persistência no ambiente e baixa toxicidade para mamíferos. Dentre os carbamatos, a classe dos N-metilcarbamatos (NMC's) têm sido uma das mais conhecidas e utilizadas<sup>2</sup>. Similarmente aos inseticidas organofosforados (OP's), o modo de ação dos inseticidas NMC's baseia-se na inibição da atividade enzimática da enzima acetilcolinesterase, AChE<sup>2-4</sup>. Essa capacidade inibidora tem sido explorada por nosso grupo de trabalho como princípio de funcionamento de biosensores altamente sensíveis, capazes de detectar pequenas quantidades desses contaminantes em alimentos<sup>5-7</sup> e

no ambiente<sup>8-11</sup>.

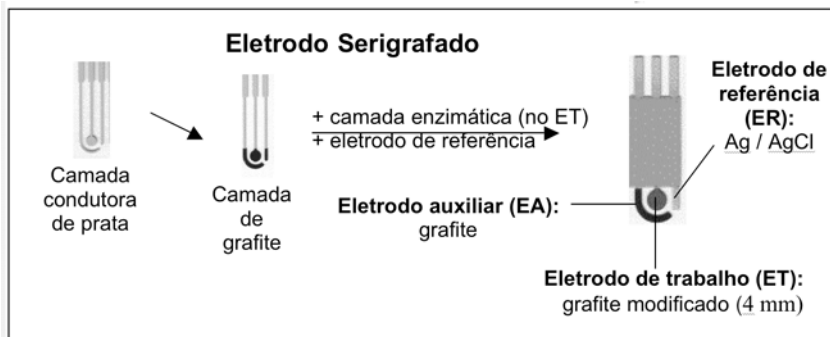
O princípio de detecção dos compostos anticolinesterases com biossensores é baseado na inativação parcial da enzima, em presença dos inibidores<sup>3-11</sup>. O tratamento da amostra é mínimo, quando se utiliza o biossensor, e consiste geralmente do ajuste do pH. A medida de inibição pode ser feita diretamente mergulhando-se o sensor na amostra, caso esta seja líquida ou possa ser liquefeita<sup>6,7,10</sup>. A inibição relativa é determinada por comparação com curvas de inibição construídas a partir de soluções padrão dos inseticidas em estudo<sup>5-8</sup>.

Nesse trabalho, foi desenvolvido um biossensor contendo uma enzima AChE geneticamente modificada, altamente sensível aos inseticidas NMC's selecionados (carbaril e carbofuran). Outros resultados de pesquisa já foram publicados pelo NARP (Núcleo de Análise de Resíduos de Pesticidas, UFMA), utilizando enzimas mutantes para melhorar a sensibilidade dos sensores em relação a outros pesticidas, como por exemplo, o inseticida OP metamidofós<sup>9,11</sup>, além de outros OP's, como clorpirifós, clorpirifós oxon, clorpirifós metílico oxon e paraoxon etílico<sup>12,13</sup>. O objetivo principal do presente trabalho foi preparar sensores o mais sensíveis possível, para detecção de resíduos dos inseticidas selecionados em alimentos infantis, e comparar as repostas com um método analítico tradicional. O efeito de matriz sobre o comportamento do biossensor foi estudado durante a análise de amostras não-tratadas.

## PARTE EXPERIMENTAL MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES

A enzima AChE comercial, extraída da enguia elétrica (ee), foi de procedência Sigma. A enzima mutante AChE (dros) B-012 foi obtida por modificação genética, no Laboratório de Genética Aplicada da Universidade de Toulouse, França, e imobilizada no sensor serigrafado de três canais, preparado na Universidade de Perpignan, França. Foi utilizado, como substrato enzimático, o cloreto de acetilcolina (ATChCl, Merck), tendo as concentrações das soluções variado de 1 a 5 mmol L<sup>-1</sup>. Durante as reações enzimáticas, o pH do meio foi controlado com solução-tampão fosfato, PBS (pH 7,5) (Merck).

Para construção dos eletrodos serigrafados, o seguinte material foi usado: pastas de prata (Electrodag PF-410, 423SS, 6037SS, marca Acheson, Plymouth, Inglaterra) (preparo dos contatos elétricos); grafite Timrex T15 (marca Lonza, Basel, Suíça) (preparo dos eletrodos auxiliar e de trabalho); mediador eletroquímico tetracianoquinodimetano (TCNQ, Sigma), misturado ao grafite, em presença de uma solução a 3% (m/v) de hidro-



**Figura 1.** Eletrodo a serigrafia de três canais: eletrodo auxiliar (grafite); eletrodo de referência (Ag/AgCl), e eletrodo de trabalho (grafite modificado com TCNQ/HEC). A parte central circular consiste do eletrodo de trabalho; nesta parte a enzima é imobilizada manualmente.

xietilcelulose (HEC, 30% na pasta de grafite). O procedimento de preparo dos eletrodos foi previamente descrito<sup>9-11</sup> e está esquematizado na *Fig. 1*. Para imobilização enzimática, foi empregada a técnica de encapsulamento da enzima em um gel de álcool polivinílico contendo grupamentos estirilpiridínicos (PVA-SbQ, Tóquio, Japão). Foi preparada uma pasta enzimática contendo 30 % (v/v) de PVA-SbQ e 70 % (v/v) da solução da enzima AChE (preparada em PBS pH 7,5). A atividade enzimática na solução de trabalho foi previamente determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Ellman<sup>14</sup>, modificado por Nunes *et al.*<sup>11</sup>. Um volume de 2µL da mistura PVA-SbQ + AChE (dros) foi depositado manualmente na superfície do eletrodo de trabalho, sendo que a atividade final da enzima foi de 1mU/eletrodo. Em seguida, os biossensores permaneceram em repouso durante um período de no mínimo 4 h sob lâmpada de neônio, a uma temperatura de 4°C. Após a fotopolimerização, os eletrodos foram deixados em repouso em refrigerador por no mínimo 2 dias antes do uso<sup>10,11</sup>.

## EQUIPAMENTOS, ACESSÓRIOS E MEDIDAS ANALÍTICAS

Para as medidas espectrofotométricas, foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro diode-array, Hewlett-Packard, modelo 8451 A (Palo Alto, EUA) e espectrofotômetro UV-Vis Beckman, modelo DU 520 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Califórnia, EUA). As medidas eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato clássico, Methrohm, modelo 641 VA (Methrohm AG Herisau, Suíça), acoplado a um registrador BD40 (Kipp & Zonen, Delft, Holanda). Para análise cromatográfica, foi utilizado um sistema HPLC composto de um detector espectrofotométrico, módulo SPD-6λ (λ variando de 195 a 700 nm), da Shimadzu, acoplado a uma bomba binária, modelo 110A (Beckman Instruments, EUA). A eluição dos compostos foi efetuada em uma coluna C<sub>18</sub> (Inertsil ODS3, diâmetro de partículas de 5µm, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno). A corrida cromatográfica foi desenvolvida no modo

isocrático, com fase móvel CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v).

### EXTRAÇÃO DOS PESTICIDAS

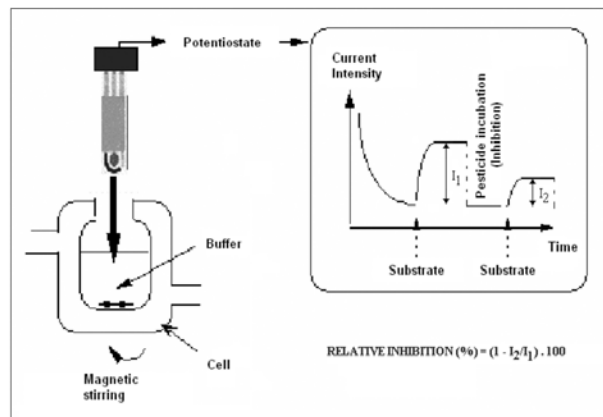
A metodologia foi baseada em um procedimento de extração em fase sólida (SPE) miniaturizado. Amostras de alimentos infantis (creme de cenoura e papinha de maçã) foram adquiridas no supermercado local e analisadas no mesmo dia, sem resfriamento. Após pesagem (10g), procedeu-se à extração em presença de 10 mL da mistura metanol/acetonitrila (1:1), sob agitação constante (300 PM, durante 10 min) em mesa agitadora. O extrato foi centrifugado e 5 mL do sobrenadante foi coletado e imediatamente submetido a sucessivas partições líquido-líquido com 10 e 5 mL de diclorometano. O extrato orgânico foi evaporado até à secura em rotaevaporador e retomado com 0,5 mL de metanol, sendo então submetido à etapa de *cleanup* em cartucho SPE C<sub>18</sub> (500 mg, Bakerbond-Baker, Califórnia, USA). Os eluatos foram evaporados até à secura pela passagem de uma corrente de N<sub>2</sub>, tendo sido os resíduos submetidos a dois tratamentos diferentes: 1) retomados com 1 ml da fase móvel (acetonitrila/água, 45:55) e injetados diretamente no sistema HPLC/UV, e 2) retomados com acetonitrila e diluídos dez vezes com PBS pH 7,5, a fim de eliminar o efeito do solvente, antes da análise com o biossensor. Todos os solventes utilizados nessa etapa foram de grau *resíduo de pesticida* (Merck, Augustburg, Alemanha).

### ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Algumas amostras foram fortificadas com concentrações de 0,1 e 0,5 mg Kg<sup>-1</sup> dos pesticidas carbaril e carbofuran, tendo sido depois submetidas ao procedimento de extração. 20 µL dos extratos obtidos foram diretamente injetados no sistema cromatográfico; 500 µL foram diluídos com PBS, para análise utilizando o biossensor. O biossensor foi mergulhado no extrato final tamponado, e a medida de inibição efetuada conforme o procedimento esquematizado na Fig. 2. As concentrações finais dos pesticidas presentes nas amostras e as recuperações foram determinados para ambos os métodos. As análises com HPLC/UV foram realizadas em duplicata, e as com o biossensor, em triplicata.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO RESPOSTA E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS BIOSENSORES

O sensor eletroquímico continha, como mediador, a espécie eletroativa tetracianoquinodimetano (TCNQ). A interação entre o mediador e o substrato (acetilcolina, ACh), responsável pela captação dos elétrons gerados durante a reação de hidrólise enzimática, já foi discutido em outros trabalhos<sup>9-12</sup>. O uso desse mediador tem sido de suma importância na construção de sensores à base de enzimas colinesterases, pois nesse caso, o potencial de trabalho, que antes era na faixa de



**Figura 2.** Esquema de inibição enzimática. Os valores de corrente foram registrados durante a reação E-S, em presença de tampão PBS pH 7,5, antes e após inibição. A inibição foi efetuada mediante incubação do biossensor no extrato diluído, contendo resíduos dos inibidores (carbaril e aldicarb).

300-500 mV em presença de outros tipos de eletrodos quimicamente modificados<sup>4-7</sup>, passou a ser menor (~100 mV) pela modificação do eletrodo de trabalho (grafite) com o TCNQ<sup>9-13</sup>; isso tem contribuído significativamente para a redução das interferências eletroquímicas provocadas por materiais eletroativos que porventura estejam presentes nas matrizes analisadas. A redução desse efeito de matriz é muito importante, já que os alimentos infantis à base de vegetais em geral contém diversas substâncias (proteínas, carboidratos, lipídios, etc), que poderiam responder eletroquimicamente<sup>9,10</sup>. Um dos fatores que contribuem muito para a sensibilidade dos sensores amperométricos é a forma de fixação da enzima no eletrodo de trabalho. O procedimento de fixação da AChE por encapsulamento em PVA-SbQ tem sido empregado com sucesso por outros grupos de pesquisa<sup>15,16</sup>, e tem levado à construção de sensores altamente reprodutíveis, uma vez que a camada biossensível não tende a se desprender dentro da solução do substrato durante as medidas eletroquímicas<sup>10</sup>. Trabalhos anteriores exploraram a fixação da AChE com glutaraldeído<sup>5-7</sup>; contudo, sabe-se que esse agente de ligação cruzada, embora tenha a capacidade de produzir biossensores bastante robustos e estáveis, possui o inconveniente de des-naturar parcialmente a AChE logo no momento do preparo da pasta enzimática, o que obriga a imobilizar uma quantidade bem maior da enzima<sup>10,16</sup>.

### REAÇÃO ENZIMA-SUBSTRATO E REPRODUTIBILIDADE DOS BIOSENSORES

Inicialmente, foi efetuada a medida cronoamperométrica, utilizando-se um sensor contendo uma AChE comercial (extraída da enguia elétrica, Sigma), em potencial fixo de 100 mV<sup>9-11</sup>, e sob agitação constante, para avaliar o comportamento da corrente estacionária obtida durante 20 min de

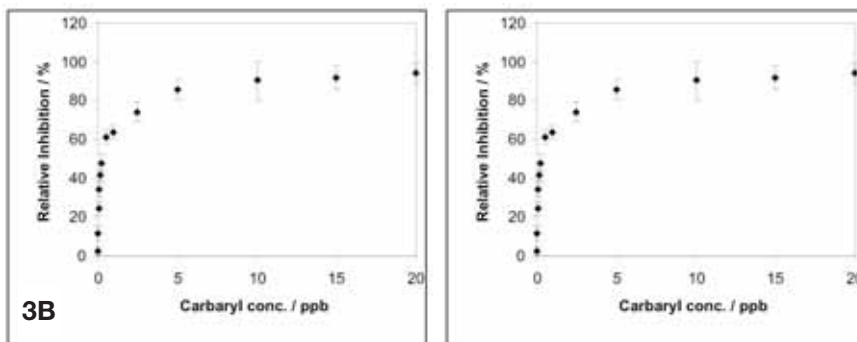
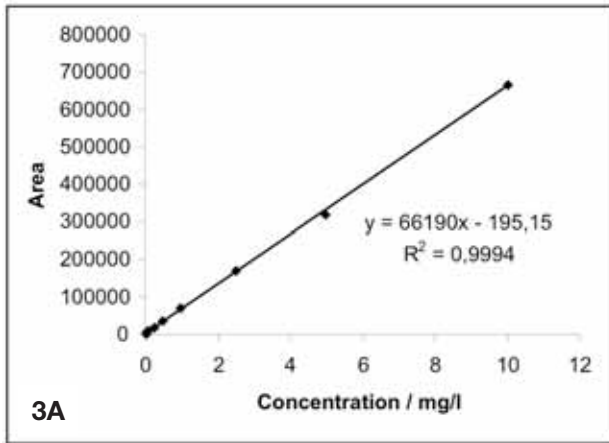


Figura 3. Curvas analíticas obtidas com soluções diluídas de carbaril, utilizando-se HPLC/UV (a) e biossensor amperométrico (b). Para o biossensor, a curva analítica foi construída a partir da inibição da enzima AChE (dros) B-012. No gráfico à direita, tem-se a faixa linear da curva de inibição.

| Técnica Analítica        | Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Limite de detecção (LD, $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Procedimento para cálculo do LD                      |
|--------------------------|--|--|--|
| HPLC/UV                  | CL: 30,0-15.000<br>CF: 2,5-10.000          | CL: 25,0<br>CF: 0,4                            | Razão sinal/ruído com valor 3                        |
| Biossensor Amperométrico | CL: 0,002-0,2<br>CF: 265-1.250             | CL: 0,005<br>CF: 250                           | 10% de Inibição Relativa da enzima AChE (dros) B-012 |

CL: carbaril; CF: carbofuran

Tabela 1. Limites de detecção instrumentais para as duas técnicas empregadas na análise de inseticidas NMC's

| Tipo de Alimento Infantil | Recuperação (%)*                             |                  |                  |                  |
|---------------------------|--|------------------|------------------|------------------|
|                           | Nível de Fortificação (mg Kg <sup>-1</sup> ) |                  |                  |                  |
|                           | HPLC/UV                                      |                  | Biossensor       |                  |
|                           | 0,1  | 0,5              | 0,1              | 0,5              |
| Creme de cenoura          | CL: 80<br>CF: 84                             | CL: 81<br>CF: 85 | CL: 91<br>CF: 66 | CL: 85<br>CF: 69 |
| Papinha de maçã           | CL: 82<br>CF: 80                             | CL: 84<br>CF: 83 | CL: 88<br>CF: 56 | CL: 80<br>CF: 63 |

\* Coeficientes de variação variando de 5 a 12 % (n = 2) para análises empregando HPLC/UV e de 6 a 26 % (n = 3) para análises com biossensor. CL: carbaril; CF: carbofuran.

Tabela 2. Recuperações médias obtidas após extração dos pesticidas e determinação final mediante as duas técnicas analíticas.

reação enzima-substrato (reação E-S). Observou-se que, em tempos acima de 10 min, não houve variação significativa de corrente e que, após 5 min de reação E-S, os valores de corrente foram mais reprodutíveis do que os obtidos com os demais tempos avaliados, com coeficiente de variação médio de 6,8 %. Foi escolhido, assim, o tempo de 5 min para medida do sinal resultante da reação E-S. Após estabilização das medidas, a intensidade de corrente registrada variou entre 150 e 200 nA, sendo essa faixa adequada para os ensaios de inibição da AChE (dros).

### SENSIBILIDADE E SELETIVIDADE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

A Fig. 3 apresenta as curvas analíticas obtidas para o inseticida carbaril, utilizando as técnicas analíticas por HPLC/UV (a) e biossensor amperométrico (b). As curvas apresentaram conformações bem diferentes. Aquela obtida por HPLC/UV mostrou-se linear dentro de uma faixa de trabalho mais ampla. Isto é particularmente interessante quando se deseja analisar amostras mais concentradas, como, por exemplo, amostras de formulações comerciais ou mesmo de alimentos. Por outro lado, a curva obtida com o biossensor apresentou uma tendência logarítmica em concentrações acima de  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , e uma faixa de trabalho bastante restrita, porém com limites de detecção (LD, em  $\text{mg L}^{-1}$ ) bem menores, ideais para determinações de resíduos em amostras de água ou avaliações toxicológicas em amostras biológicas (sangue, urina, suor, etc.), onde apenas traços do pesticida podem ser encontrados. Para efeito de comparação, a Tab. 1 mostra as faixas lineares de trabalho e o valores de LD obtidos com soluções diluídas dos compostos carbaril e aldicarb, preparadas em água deionizada. A técnica cromatográfica apresentou maior sensibilidade para o inseticida carbofuran (LD de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), enquanto que, com o biossensor, um LD bem mais elevado ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi encontrado. Isso vem demonstrar que a engenharia genética, nesse caso, promoveu uma modificação tal na estrutura da enzima AChE proveniente da *Drosophila melanogaster*, que a sen-

de para o inseticida carbofuran (LD de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), enquanto que, com o biossensor, um LD bem mais elevado ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi encontrado. Isso vem demonstrar que a engenharia genética, nesse caso, promoveu uma modificação tal na estrutura da enzima AChE proveniente da *Drosophila melanogaster*, que a sen-



sibilidade do mutante B-012 em relação ao carbaril foi intensamente incrementada, o que não ocorreu com o carbofuran. Assim, alterações na estrutura molecular da enzima podem ser realizadas, não só visando ao aumento da sensibilidade do sensor, mas também da sua seletividade.

### EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

A Fig. 4 mostra um cromatograma obtido a partir da análise por HPLC/UV de um extrato de creme de cenoura fortificado com carbaril. O composto foi eluído em ~ 9 min. O carbofuran foi eluído em um tempo de ~ 7,5 min, sob mesmas condições analíticas. Os co-extrativos, quando presentes, estiveram em pequenas quantidades e foram eluídos em tempos de retenção inferiores a 3 min, o que indicou que a etapa de purificação dos extratos nos cartuchos C<sub>18</sub> foi adequada; os cromatogramas apresentaram-se, portanto, 'limpos', o que facilitou a identificação e a quantificação dos picos de interesse. Trabalhos anteriores já demonstraram a adequada sensibilidade do método por HPLC/UV para análise de resíduos de inseticidas NMC's em alimentos, incluindo os selecionados no presente estudo (5-7), muito embora o método cromatográfico mais sensível, e, portanto, mais indicado para esse tipo de análise, seja ainda aquele que envolve a derivação dos compostos em pós-coluna e a sua detecção final por fluorescência<sup>17</sup>. Contudo, esse equipamento é extremamente caro, e a análise, laboriosa.

A Tab. 2 apresenta os dados médios de recuperação, após extração e análise dos pesticidas nas amostras. Nesse caso, foram analisados, por HPLC, os extratos orgânicos, e pelo biossensor, os extratos diluídos em PBS. As recuperações variaram de 80-85 % (RSD: 5-12 %) e de 56-91 % (RSD: 6-26 %) para os métodos empregando HPLC/UV e biossensor, respectivamente. Menores recuperações foram observadas para o caso dos extratos analisados com o biossensor, tendo sido as recuperações maiores (80-91 %) para o inseticida carbaril, provavelmente em função da maior sensibilidade da enzima mutante em relação a esse composto (Tab. 1). É interessante observar que maiores coeficientes de variação foram obtidos com medidas efetuadas com o biossensor, o que pode ser atribuído aos erros de diluição e ao procedimento de imobilização enzimática. Aqui, a enzima foi imobilizada manualmente, o que pode ocasionar alguma flutuação de resposta entre um sensor e outro. Tal efeito já foi observado em trabalhos anteriores<sup>9,10</sup>. Convém mencionar que, no presente trabalho, a detecção dos compostos utilizando o biossensor foi feita nos extratos diluídos, pois o objetivo era validar o sensor por uma técnica convencional de análise e, neste caso, o procedimento de extração teve de ser igual para ambos os métodos. Porém, o biossensor também demonstrou aplicabilidade quando utilizado diretamente na análise de amostras com um mínimo pré-tratamento: ajuste da

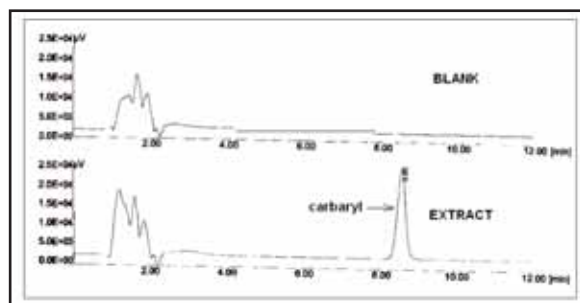


Figura 4. Cromatograma HPLC/UV obtido de extrato de creme de cenoura. Tempo total de eluição: 10 min. Condições operacionais: coluna C<sub>18</sub> (Inertsil ODS3); modo isocrático; fase móvel CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v); temperatura ambiente.

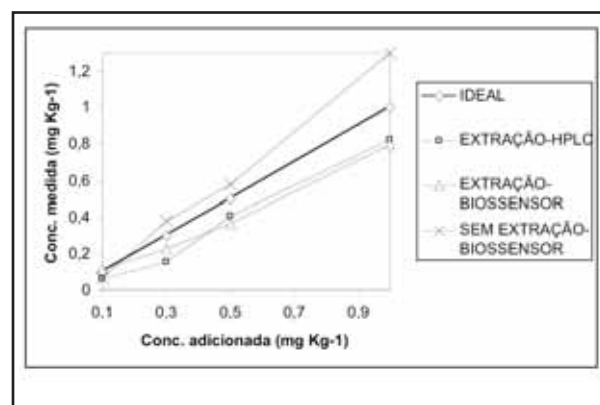


Figura 5. Gráfico de resposta dos métodos analíticos, avaliados através dos ensaios de recuperação para o inseticida carbaril. Níveis de fortificação: 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 mg Kg<sup>-1</sup>; amostra: papinha de maçã.

acidez com PBS pH 7,5. Para ilustrar o efeito de matriz sobre a resposta do biossensor, a Fig. 5 apresenta os gráficos de resposta, obtidos das análises efetuadas com o biossensor mergulhado diretamente em amostras de papinha de maçã, ou utilizando os extratos cromatográficos. Todas as amostras foram fortificadas com concentrações crescentes do inseticida carbaril. As inibições relativas foram calculadas e, para ambos os casos, extrapoladas na curva analítica. A simulação das condições leva ao estabelecimento de uma situação ideal (curva IDEAL), na qual os valores de concentração encontrados nos extratos analisados coincidem com os valores obtidos após extração. Na prática, tal situação não é possível na maioria das vezes, pois perdas durante o processo de extração podem ocorrer, além dos erros instrumentais e do próprio analista. Aqui, observou-se que o procedimento de extração levou a perdas, pois o mesmo extrato analisado pela técnica HPLC (curva "extração-HPLC") e pelo biossensor (curva "extração-biossensor") mostrou concentrações menores que as adicionadas. Contudo, quando a amostra foi fortificada com teores de carbaril abaixo de 0,3 ppm, o método cromatográfico subestimou ainda mais os resultados. Acima de 0,5 ppm, as recuperações foram

ligeiramente menores nas análises com o biossensor, muito provavelmente devido às sucessivas diluições do extrato. Quando o alimento não foi submetido a nenhum processo de extração, tendo sido diretamente diluído com o tampão PBS pH 7,5 (curva "sem extração-biossensor"), um efeito de matriz foi observado, com desvios de resultados para valores mais elevados, sobretudo em maiores concentrações do inibidor. Como o pH do meio estava dentro da faixa ideal para a atividade da AChE, pode-se inferir sobre a possibilidade de a amostra conter, além do carbaril adicionado, que é um forte inibidor, alguns componentes naturais que poderiam também provocar a inibição da AChE. Tal afirmativa carece, entretanto, de comprovação por comparação com outros tipos de matrizes vegetais.

Apesar das medidas de inibição terem sido superestimadas pelo biossensor, durante a análise de amostras reais tamponadas, na prática, pode-se observar que a medida direta é viável. O efeito de matriz, entretanto, é um fator que deve ser levado em consideração, já que este pode levar a resultados falsamente positivos. Efeitos de matriz sobre atividades enzimáticas podem ser observados também quando se empregam métodos imunológicos, como é o caso daqueles baseados em ELISA<sup>1</sup>.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da utilização de um biossensor amperométrico para a detecção de resíduos de inseticidas carbamatos em alimentos infantis. Os resultados apresentados permitem-nos concluir que a sensibilidade dos sensores baseados em enzimas acetilcolinesterases mutantes pode ser substancialmente aumentada, dependendo do tipo de modificação genética realizada na estrutura da molécula enzimática. Assim, no presente estudo, a modificação da enzima extraída da *Drosophila melanogaster* fez melhorar o limite de detecção do sensor em relação ao inseticida carbaril, da ordem de partes por bilhão para partes por trilhão. O contrário foi verificado para o inseticida carbofuran, pois a enzima modificada mostrou-se pouco sensível a esse composto, sendo pouco inibida até mesmo em concentrações mais elevadas. Em outras palavras, em um meio contendo resíduos desses dois pesticidas, um sensor contendo a enzima mutante AChE (dros, B-012), investigada nesses estudos, poderá enxergar o carbaril e praticamente ignorar a presença do carbofuran. Este é um exemplo típico de engenharia genética onde a alteração na sensibilidade enzimática pode influenciar na seletividade do método.

Do ponto de vista de controle de qualidade, o uso de técnicas bioanalíticas, como, por exemplo, as que empregam ELISA e biossensores, para detectar resíduos de pesticidas em alimentos infantis pode resultar em um meio de controle mais rápido e eficaz, em função da sua elevada sensibilidade

e da relativa seletividade. Neste trabalho, o biossensor eletroquímico foi empregado testado na análise de amostras de alimentos infantis que não sofreram nenhum tipo de tratamento (extração, purificação, etc.), simplesmente mergulhando-os diretamente nas papinhas tamponadas, e medindo a inibição provocada pela presença dos pesticidas. O efeito de matriz, com valores de inibição enzimática em alguns casos superestimados, pode levar a resultados falsamente positivos. Contudo, o biossensor se mostrou extremamente eficiente, na medida em que pode fornecer respostas rápidas com medidas relativamente simples, sendo adequado, inclusive, para a realização de estudos toxicológicos e ecotoxicológicos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, pelo apoio financeiro. Agradecem, ainda, ao Prof. Dr. Didier Fournier (Université Paul Sabatier, Toulouse, França), por gentilmente haver cedido a enzima acetilcolinesterase mutante.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Nunes, G. S. (2004) Métodos imunológicos para análise de resíduos de pesticidas *Analytica*. 10, 50-59.
2. Hassal, K. A. *The Chemistry of Pesticides: Their Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection*. MacMillan, New York, NY, 1983. 264 p.
3. Nunes, G. S.; Tanaka, S. M.; Marques, P. B. O.; Lima, F. J. C. (2001). Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. *Pesticidas Rev. Ecotox M Ambiente*. 11,17-34.
4. Nunes, G. S. (1996). Determinação de pesticidas utilizando biossensores à base de enzimas colinesterases: uma revisão. *Pesticidas Revista Técnico Científica*. 6, 13-30.
5. Nunes, G. S. Skládál, P. Ribeiro, M. L. and Yamanaka, H. (1997). Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. *Electroanalysis*. 9, 1083-1087.
6. Nunes, G. S. Barceló, D. Grabaric, B. S. Díaz-Cruz, J. M. and Ribeiro, M. L. (1999). Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. *Anal. Chim. Acta*. 399, 37-49.
7. Nunes, G. S. Skládál, P. Yamanaka, H. and Barceló, D. (1998). Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques. *Anal. Chim. Acta*. 362, 59-68.
8. Nunes, G. S. Queiroz, M. E. R. Orlando, J. F. F. and Sousa, H. S. (2002) Análise de pesticidas em amostras ambientais (água e sedimentos) oriundos da Barragem da Boa Esperança, MA-PI. *Pesticidas: Rev. Ecotox. M. Amb*. 12, 1-6.
9. Marques, P. B. O. Nunes, G. S. Santos, T. C. R.

Andreescu, S. and Marty, J.-L. (2004). Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*: Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Bios. Bioelectron.* 20, 825-832.

**10.** Nunes, G. S. Jeanty, G. and Marty, J.-L. (2004). Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. *Anal.Chim. Acta.* 523, 107-115.

**11.** Nunes, G. S.; Montesinos, T.; Marques, P. B. O.; Fournier, D. and Marty, J.-L.(2001) Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide: Evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. *Anal. Chim. Acta.* 434, 1-8.

**12.** Fournier, D.; Nunes, G. S.; Marty, J.-L.(2005). Biotools based on engineered-cholinesterases for the detection of insecticides. 28<sup>ª</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Livro de Resumos, Poços de Caldas, MG.

**13.** Nunes, G.S., Badea, M.; Marty, J.-L. Rapid detection of pesticides in water samples using amperometric cholinesterase sensors. Brasov EDU Conference, Brasov, Romania, 2004, pag. 13.

**14.** Ellman, G. L., Courteny, K. D. A., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1, 88-90.

**15.** Andreescu, S. Barthelmebs, L.; Marty, J.-L. (2002). Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta.* 464, 171-180.

**16.** Bonnet, C. Andreescu, S. and Marty, J.-L. (2003). Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta.* 481, 209-211.

**17.** Nunes, G. S. Santos, T. C. R; Barceló, D.; Pimenta, A. S.; Ribeiro, M. L. (2002). Extração por Fluido Supercrítico de Alguns Inseticidas Carbamatos em Amostras de Batata, com Determinação por HPLC/Fluorescência e Confirmação por HPLC/Espectrometria de Massas. *Quim. Nova.* 25, 214-220.

## SPHINGANINE/SPHINGOSINE (SA/SO) RATIO AND INTAKE OF FUMONISIN CONTAMINATED TORTILLAS IN A MEXICAN POPULATION

Patricia Landeros (1), Waldina Reyes (1), Adriana M. Torres (2\*), Federico Rojo (2), Sofia N. Chulze (2\*).

1. Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Km. 15.5 carretera a Nogales, Zapopan, Jalisco, México. Código Postal 44100, plander@cucba.udg.mx

waldinar@cucba.udg.mx Telefono y fax: (33) 36 82 05 74

2. Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km, 601 (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Código Postal 5800, frojo@exa.unrc.edu.ar atorres@exa.unrc.edu.ar schulze@exa.unrc.edu.ar

\* Members of the Research Career of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Sofia Chulze. Fax: 54-358-4676231, Email: schulze@exa.unrc.edu.ar

**ABSTRACT.** Landeros, P.; Reyes W.; Torres A. M.; Rojo F.; Chulze S. N. **Sphinganine/sphingosine (Sa/So) ratio and intake of fumonisin contaminated tortillas in a Mexican population.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (2): 8-11.* The fumonisins are mycotoxins relevant due to their toxicological effects on animals and humans. Based on the current knowledge of the mechanism of action of fumonisins, the sphinganine/sphingosine (Sa/So) ratio is a valid biomarker of exposure in animal studies and could also be useful in human studies if the ratio correlate with fumonisin intake. The Sa/So ratio was evaluated in a Mexican population at three stages of maize based food (tortillas) consumption. A Sa/So ratio higher than 1 was found at the A (regular consumption) and C (re-assumption of the regular consumption) stages, while during the B (stopping of the tortillas consumption for two weeks) stage the Sa/So ratio was lower than 1. This report showed that there is an association between the intake of fumonisin contaminated maize based foods and the elevation of the Sa/So ratio in human samples. Mexican population is exposed with a continuous high consumption of maize based foods commonly contaminated with fumonisins. Palabras claves: Etanol; metanol; jugos; bebidas amargos; GC-FID

**RESUMEN.** Landeros, P.; Reyes W.; Torres A. M.; Rojo F.; Chulze S. N. **Relación esfinganina/esfingosina (Sa/So) y consumo de tortillas contaminadas con fumonisinas en una población Mexicana.** *Acta Toxicol. Argent. (2005) 13 (2): 8-11.* Las fumonisinas son micotoxinas relevantes debido a sus efectos en animales y humanos. Basados en el actual conocimiento sobre el mecanismo de acción de las fumonisinas, la relación esfinganina/esfingosina (Sa/So) es considerada un biomarcador de exposición en estudios de animales y pudiera también ser útil en estudios de humanos si es correlacionada con el consumo de fumonisinas. La relación Sa/So fue evaluada en una población mexicana en tres etapas de consumo de alimento a base de maíz. Se encontró una relación mayor a 1 en las etapas A (regular consumo de tortillas) y C (una semana posterior al retorno de consumo normal de tortillas), mientras que durante la etapa B (sin consumo de tortillas por dos semanas) la relación Sa/So fue menor a 1. El presente trabajo demostró que existe asociación entre el consumo de alimentos a base de maíz contaminados con fumonisinas y la elevación de la relación Sa/So en humanos. La población mexicana esta expuesta a un consumo alto y continuo de alimentos a base de maíz comunmente contaminados con fumonisinas.

**Keywords:** sphinganine, sphingosine, biomarker, fumonisins

**Palabras claves:** esfinganina, esfingosina, biomarcadores, fumonisinas

### INTRODUCTION

The impact of mycotoxins on human and animal health results in serious economic implications for crop, livestock, and poultry producers, food and feed processors, consumers, and for crop trading between different countries affecting their national economies.

Fumonisins are produced mainly by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*, two pathogens of maize, so that these mycotoxins occur largely in maize and maize based foods and feeds worldwide and populations with high maize consumption are exposed to these mycotoxins<sup>1,2,3</sup>.

Maize (*Zea mays* L) represents 51% of crop production in Mexico<sup>4</sup>. The human consumption is approximately 300 g/day providing 56% of the calories and 47% of the proteins for the Mexican population. Around 72% of the maize production is transformed by a process call nixtamalization in the manufacture of tortillas.

In Mexico, Desjardins *et al.*<sup>5</sup> found *F. verticillioides* in 61% of white maize samples intended for

human consumption; the strains isolated produced fumonisins at levels ranging from 10 to 9000 ppm. In another study maize samples collected from the Jalisco State showed contamination with *F. verticillioides* in 84% of the samples, and the strains isolated produced levels of fumonisins ranging from 700 to 2280 ppm<sup>6</sup>.

The nixtamalization process carried out in Mexico from naturally contaminated maize, as raw material, was evaluated by Dombrink-Kurtzman and Dvorak<sup>7</sup>. The results showed that fumonisin contamination was detected in different products including masa and tortillas. The mean levels for Mexican and USA samples were 0.79 ppm and 0.16 ppm, respectively. Another study done in Mexico showed an FB<sub>1</sub> level of 7.2 ppm and FB<sub>2</sub> 0.14 ppm for maize; FB<sub>1</sub> 6.3 ppm and FB<sub>2</sub> 0.06 ppm for masa; and FB<sub>1</sub> 4.4 ppm and FB<sub>2</sub> 0.05 ppm for tortillas<sup>6</sup>.

The fumonisins show a remarkable structural similarity to the sphingoid base sphingosine and have

been found to inhibit sphingolipid biosynthesis at the level of sphingosine (sphinganine) *N*-acyltransferase<sup>8</sup>. Based on current knowledge of the mechanism of action of fumonisins, the sphinganine/sphingosine (Sa/So) ratio is a valid biomarker of exposure in animal studies<sup>9</sup> and could also be useful in human studies if the ratio correlated with fumonisin intake<sup>10</sup>. Due to the high incidence of fumonisin both in maize and maize based foods in Mexico the availability of a biomarker will be essential for determining human exposure to fumonisins, allowing evaluation at an individual level, as recommended by WHO<sup>11</sup>.

The aims of this work were: - to categorize a population with different maize based foods (tortillas) consumption in Mexico using an alimentary survey, - to determine the Sa/So ratio in the urine in the different groups under study, - to determine the levels of fumonisins in the tortillas consumed by the population under study.

## MATERIAL AND METHODS

A population of 38 volunteers including 23 males and 15 females was chosen for this study. Groups were divided according to the consumption of maize based food as follows: high consumption (> 10 tortillas daily), medium consumption (4-10 tortillas daily) and low consumption (< 4 tortillas daily).

**Sphinganine and sphingosine analysis.** Urine samples were collected at three stages, A) at the beginning of the experiment (individual that consumed the normal diet with high, medium and low tortillas consumption), B) after two weeks without consumption of any type of maize based foods and C) one week after the re-assumption of normal tortillas consumption. Urine samples (10 ml) were analysed within two weeks after collection, keeping the samples at about 4°C before extraction and analysis. The urine samples were analysed to determine sphinganine and sphingosine concentration according to methodology described by Solfrizzo *et al.*<sup>19</sup> and analysed by reversed phase HPLC with fluorescence detection. The quantitation limit was 0,02 ng/ml.

**Fumonisin analysis.** Thirty eight samples (20 tortillas by sample) donated by each volunteer were analysed, 10 tortillas by sample during the A stage and 10 during the C stage. The samples were ground and dried at 40 °C during 48 hs. Tortilla samples were analyzed to determine the level of fumon-

isin contamination according to the methodology described by Shephard<sup>13</sup>, modified by Doko *et al.*<sup>14</sup>.

**FB<sub>1</sub> daily intake of the population.** To estimate the FB<sub>1</sub> intake of the population under study, the mean body weight was considered to be 67.3 kg. Also the mean maize intake was calculated for each group (high, medium and low consumers) considered the g/day of tortillas calculated from volunteer interviews, and the mean fumonisin B1 level detected in the tortillas. The intake was calculated following equation of Qiu and Liu<sup>15</sup>.

**Statistical analysis.** Data on Sa/So ratio were analysed using One way ANOVA to detect if there was significant differences among tortillas consumption (high, medium and low), fumonisin content of the tortillas, and between sex. To detect significant differences among the consumption stages (A, B and C) the data were analysed using Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks. When the differences in the mean values among the treatment groups were greater than would expected by chance (P= 0.001) the Tukey's test was used for comparison among stages.

## RESULTS

The FB<sub>1</sub> levels found in the tortillas, consumed by volunteers during the A stage, ranged from 1.21 to 3.12 ppm. There were no significant differences among the groups (high, medium and low tortillas consumption) in the estimated mean fumonisin intake and the Sa/So ratio (*Table 1*). Significant differences by sex were not found in the Sa/So ratio, being this values for female (n=15) of 1.15 ± 0.21 and for male (n=23) of 1.23 ± 0.31. Due to the lack of significant differences in relation to sex and consumption of fumonisins by the groups, the evaluation on the Sa/So ratio was considered according to the period in which the urine samples were collected. In the first stage (A), the population

**Table 1:** Fumonisin content of tortillas samples donated per volunteers, mean fumonisin daily intake and SA/SO ratio of volunteers involved in the study.

| Tortillas consumption | Mean ± SD FBs in tortillas (ppm) | Mean tortillas intake of volunteers g/kg bw per day | Mean fumonisin intake of volunteers ug/kg bw per day | Sa/So ratio Mean ± SD    |
|-----------------------|----------------------------------|---|--|--------------------------|
| High                  | 1.21 ± 0.8 <sup>a</sup>          | 4.45  | 5.3 <sup>a</sup>                                     | 1.14 ± 0.34 <sup>a</sup> |
| Medium                | 1.82 ± 1.3 <sup>a</sup>          | 2.97  | 5.4 <sup>a</sup>                                     | 1.18 ± 0.22 <sup>a</sup> |
| Low                   | 3.12 ± 1.2 <sup>a</sup>          | 1.48  | 4.6 <sup>a</sup>                                     | 1.23 ± 0.31 <sup>a</sup> |

A Obtained by multiplying the mean tortillas intake by mean fumonisin content of tortillas. samples. The same letter in a column indicates no significant differences (p < 0.05).

Table 2: Fumonisin content of tortillas samples donated per volunteers, mean fumonisin daily intake, and SA/SO ratio of volunteers at different stages of tortillas intake.

| Stage | Mean FBs in tortillas (ppm) | Mean tortillas intake of volunteers g/kg bw per day | Mean fumonisin intake of volunteer-sug/kw per dayA | Sa/So ratio Mean $\pm$ SD   |
|-------|-----------------------------|---|--|-----------------------------|
| A     | 2.05                        | 2.97  | 6  | 1.19 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> |
| B     | -                           | 0   | 0  | 0.78 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> |
| C     | 1.75                        | 2.97  | 5,1  | 1.08 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> |

Different letters in a column indicate significant differences according to Friedman repeated measures analysis of variance on ranks, Tukey test ( $p < 0.05$ ).

evaluated consumed tortillas with a FB<sub>1</sub> mean level of 2.05 ppm, representing a mean fumonisin intake of 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw per day. In the second stage (B) there was no fumonisin consumption because the volunteers were private to eat corn based food. At the third stage (C) the FB<sub>1</sub> mean level in the tortillas was 1.75 ppm representing a mean fumonisin intake of 5.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw per day. The Sa/So ratio was higher than 1 in both A and C stages, 1.19 and 1.08, respectively. We found significant differences ( $p < 0.05$ ) in the Sa/So ratio between these stages and B stage, which the mean ratio was 0.78 (Table 2).

These results are relevant since they indicate that a restriction in the consumption causes a reduction in the levels of the sphingoid bases in urine, the ratio Sa/So being lower than 1 at the B stage. In the C stage when the population returns to the consumption of natural contaminated tortillas diet the ratio Sa/So was higher than 1.

## DISCUSSION

Although in the present study the levels of FB<sub>1</sub> found in the tortillas consumed by the population under study were relatively low compared to a previous survey on the same area (Reyes Velazquez, personal communication), this study showed a direct relation among FB<sub>1</sub> intake and changes in the Sa/So ratio, since it was demonstrated that changes in the Sa/So ratio occurred when the population stopped fumonisin intake and this ratio went up again when the population resumed the intake. Similar results were shown in studies on rats<sup>9,16</sup>. Due to the levels of consumption of maize based food, Mexican population are exposed to a continuous fumonisin intake. This condition could explain the high Sa/So ratio detected in the population under study.

Reports of oesophageal cancer in Mexico are scarce but a high incidence of neural tube defects

(NTD) has been shown in populations from the north of Mexico. This pathology could be related to the high levels of fumonisin to which this population could be exposed. This is supported by Marasas *et al.*<sup>17</sup> who reported that the NTD can be reduced by folate supplementation and explained the possible contribution of fumonisin to this pathology, mainly in human populations with a continuous fumonisin exposure. Data on the daily consumption of fumonisin by the groups indicate the toxicological

risk to which the population is exposed, since the levels of fumonisin consumption are higher than 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day, the provisional maximum tolerable daily intake for fumonisins proposed by WHO<sup>1</sup>. The increased Sa/So ratio as a biomarker for fumonisin exposure has been largely demonstrated in animal studies and has been proposed as a possible biomarker in human studies<sup>10</sup>. This biomarker has been validated in animal studies by demonstrating in pigs and rats a positive correlation between the Sa/So ratio and the dose or time of exposure to fumonisins through the diet<sup>18,20</sup>. The minimum level of fumonisins in the diet capable of eliciting the urinary Sa/So ratio increase in rats was about 2 ppm, equivalent to 130  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day in short term experiments<sup>19</sup>. Lower levels of fumonisins in the diet (1 ppm) also increased the urinary Sa/So ratio in rats previously exposed to a diet containing 10 ppm of FB<sub>1</sub><sup>20</sup>.

The mean level of fumonisins found in the tortillas samples collected in Mexico, corresponding to a mean fumonisin intake of 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day, is about 24 times lower than the minimum level of fumonisins that elevated urinary Sa/So ratios in rats. However, it is likely that the population under study has been previously exposed to higher fumonisin levels. Based on the present investigation it can be concluded that: human urine samples from Mexico showed mean Sa/So ratios higher compared to control populations from low maize consumption regions (0.39, 0.35, 0.11, 0.20) as was reported by Solfrizzo *et al.*<sup>21</sup> and Castegnaro *et al.*<sup>22</sup>. The prolonged ingestion of maize and maize-based products, presumably contaminated with fumonisins, may explain these results, but the role of other confounding factors cannot be ruled out.

The fumonisin intake by the population under study was higher than 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day, the level established by the Joint FAO/WHO Expert

Committee on Food Additives (JECFA) <sup>1</sup>. Also a TDI of 2 µg/kg/day bw for fumonisins has been recently confirmed by the Scientific Committee on Food<sup>23</sup>, it must be taken into account that we have included only tortillas in the fumonisin intake estimation. Although tortillas are the main maize based food consumed by the population, other maize based foods could also contribute to the Sa/So ratio higher than 1 found among the population under study. The mean daily fumonisin intake in the population under study was 10 times higher than the values reported in populations from South Brazil and North Argentina<sup>21</sup> this can explain why the authors did not find correlation between the intake of fumonisin and the SA/SO ratio. Based on our results Mexican populations could be high exposed to fumonisin. Further studies need to be done to validate Sa/So ratio as a biomarker in populations chronically exposed to fumonisin levels.

### Acknowledgements

This work was supported by a grant from Guadalajara University, Mexico and CONICET from Argentina. We thanks to Dr. Peter Scott for reading the manuscript and his suggestions.

### REFERENCES

1. World Health Organization (WHO) (2001) Fumonisins. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74 (Geneva: WHO), 103-279 pp.
2. Marasas WFO (1996) Fumonisins: History, world wide occurrence and impact. In: Jackson LS, Devries JW, Bullerman LB (eds) Fumonisins in food. Plenum Press New York, 1-17 pp.
3. Shephard GS, Thiel PG, Stockenström S, Sydenham EW (1996) Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn based products. *J AOAC Int.* 79: 671-687.
4. González, A. V. 1995, El maíz y su conservación. Ed. Trillas, Mexico. 214-251 pp.
5. Desjardins AE, Plattner RD, Nelson PE (1994) Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* from maize in northeast Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 60:1695-1697.
6. Reyes WP (2001) Detección del hongo *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de sus hidrolizados. PhD Thesis, Universidad de Guadalajara, Mexico.
7. Dombrink-Kurtzman MA, Dvorak TJ (1999) Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *J Agric Food Chem.* 41: 1649-1654.
8. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.* 266: 14486-14490.
9. Riley RT, Wang E, Merrill, AH, Jr (1994) Liquid chromatographic determination of sphinganine to sphingosine: Use of the free sphinganine-to sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J AOAC Int.* 77: 533-540.

10. Turner PC, Nikiema P, Wild CP (1999) Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mut Res.* 443: 81-93.
11. World Health Organization (WHO) Fumonisin B1. Environmental Health Criteria 219. (Geneva: WHO).
12. Solfrizzo M, Avantaggiato G, Visconti A (1997) Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatography B.* 692: 87-93.
13. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA (1990) Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liquid Chromatography* 13: 2077-2080.
14. Doko B, Rapior S, Visconti A, Schjoth J (1995) Incidence and levels of fumonisins contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J Agric Food Chem* 43: 429-434.
15. Qiu M, Liu X (2001) Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B1. *Food Add Contam.* 18: 263-269.
16. Castegnaro M, Garren L, Galendo D, Gelderblom WCA, Chelule P, Dutton MF, Wild CP (1998) Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatography B,* 720, 15-24.
17. Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sandler TW, Gelineau-Van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH, Jr (2004) Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutrition* 134: 711-716.
18. Riley RT, An NH, Showker JL, Yoo HS, Norred WP, Chamberlain WJ, Wang E, Merrill AH Jr, Motelin G, Beasley VR, Haschek WM (1993) Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 118: 105-112.
19. Solfrizzo M, Avantaggiato G, Visconti A (1997b) In vivo validation of the sphinganine/sphingosine ratio as a biomarker to display fumonisin ingestion. *Cereal Research Communications* 25: 437-442.
20. Wang E, Riley RT, Meredith FI, Merrill AH Jr (1999) Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *J Nutrition* 129: 214-220.
21. Solfrizzo M, Chulze SN, Mallmann C, Visconti A, De Girolamo A, Rojo F, Torres A (2004) Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Add Contam.* 21: 1090-1095.
22. Castegnaro M., Garen L, Gaucher I, Wild CP (1996) Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. *Natural Toxins* 4:284-290.
23. European Commission: Scientific Committee for Food (2003) Updated opinion of the Scientific Committee on Food on Fumonisin B1, B2 and B3. Available on line at [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out185\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out185_en.pdf)

# JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

---

**Asociación Toxicológica Argentina (ATA)**

**Universidad Argentina de la Empresa  
(UADE)**

**Asociación Argentina de Tecnólogos  
Alimentarios (AATA)**



Lima 717, Ciudad Autónoma de Buenos Aires - 19, 20 y 21 de septiembre de 2005



## AUTORIDADES DE LAS JORNADAS

---

**PRESIDENTE:**

Otmaro ROSES

**COMISIÓN ORGANIZADORA**

**Presidente:** Alberto Eduardo ETIENNOT

**Vicepresidente:** Antonio Horacio FRADE

**Secretaria General:** Susana I. GARCÍA

**Secretaría Técnica:** María Juliana SIMONE

**Tesorera:** Claudia Alejandra SWIECKY

**Vocales:** Sandra DEMICHELIS; Adriana HAAS

**COMITÉ CIENTÍFICO**

Alejandro ARIOSTI

Elda CARGNEL

José Ignacio CARRETTO

Oswaldo COTELLA

Adolfo DE ROODT

Graciela Edith DIAZ

Ana EVANGELISTA DE DUFFARD

Teresa FONOVICH

Diana GONZÁLEZ DE CID

Alba MUSTACCIOLLO

Ana PACIN

Ricardo SOBOL

Dinoraz VELEZ PACIOS

Edda VILLAAMIL

---

**ASOCIACION TOXICOLOGICA ARGENTINA**

**COMISION DIRECTIVA**

**Presidente**

Oswaldo H. Curci

**Vicepresidente**

Lucrecia Ferrari

**Secretario**

Sandra Demichelis

**Tesorero**

Susana I. García

**Vocales**

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

**Vocales suplentes**

Eduardo Brocca  
Adriana A. Pérez

**Tribunal de Honor**

Mauricio R. Plager  
Alfredo Salibian  
María del Carmen  
Villarruel

**Comité Científico**

Gerardo D. Castro  
Juan C. Piola  
Otmaro E. Roses  
Edda Villaamil  
Eduardo N. Zerba

**Órgano de  
Fiscalización**

**Miembros titulares**

María L. Oneto  
Otmaro E. Roses

**Miembro suplente**

Raúl A. Alzogaray

---

**ASOCIACIÓN ARGENTINA DE  
TECNÓLOGOS ALIMENTARIOS**

**COMISION DIRECTIVA**

**Presidente**

Gabriel Durand

**Vicepresidente**

Patricia Hartenstein

**Secretario**

Gustavo Locati

**Prosecretario**

Margarita Olivera

**Tesorero**

Carlos Almada

**Protesorero**

Carlos Campi

**Vocales**

Orlando Araujo  
M. Del Carmen  
Benavente  
Ernesto Bertschi

Irene Dasso  
Roberto Urrere  
Susana Vidales

**Vocales suplentes**

Stella Alzamora  
Mariano Czastkiewicz  
Guillermo Richiello

**Revisores de cuenta**

Lia Gerschenson  
Néstor E. Galibert

**Gerente ejecutivo**

Ma. Juliana Simone

## RESÚMENES

### **Conferencia: EVALUACIÓN DE RIESGO A LA INTOXICACIÓN POR MICOTOXINAS.**

**DRA. ANA PACIN CIC, CIM-UNLU, FICTBC.**

La evaluación de riesgos está basada en conocimientos científicos: (1) determinación del peligro, (2) caracterización del peligro, (3) evaluación de la exposición, y (4) caracterización del riesgo.

Hablando de micotoxinas implica: • La estimación de ingesta de alimentos en especial aquellos de mayor consumo por la población. • El conocimiento del nivel de contaminación de materia prima, alimentos elaborados, y/o efecto de los procesos • Estimación de la exposición, expresada como Ingesta Diaria para determinada/s micotoxina/s, que se compara con valores de Ingesta Tolerable o Admisible Diaria (IDA).

Para estimar la IDA, se consideran los datos de toxicidad animal relacionados con la toxicidad crónica o con la dosis que no produce efecto: NEL o NOEL; a las cuales se aplican factores de seguridad y así se llega a la IDA.

Esta evaluación se continúa con la Gestión, que es la selección y aplicación de las posibles medidas de control; y la Comunicación del riesgo, que es el intercambio de información y opiniones sobre los riesgos, entre las personas encargadas del control y otras partes interesadas.

Los objetivos fundamentales para realizar la evaluación de riesgo a micotoxinas son:

1. Disponer de datos para establecer valores límites de seguridad, que eviten o por lo menos disminuyan la posibilidad de micotoxicosis
2. aportar a la agroindustria un dato fidedigno para ser utilizado en la comercialización.

Para llevar a cabo este procedimiento es necesario que cada país o región estime su ingesta de alimentos con una determinada frecuencia y conozca los niveles de contaminación, y la frecuencia de los alimentos consumidos por la población.

### **MESA REDONDA: TOXINAS DE FLORACIONES ALGALES.**

**COORDINA: MARÍA ISABEL YEANNES (CONICET- UNMDP)**

### **UNA REVISIÓN DEL ESTADO DEL CONOCIMIENTO DE LAS FLORACIONES ALGALES TÓXICAS EN EL MAR ARGENTINO**

Carreto, José I y Montoya, Nora. INIDEP

Durante la primavera de 1980 se produjo el primer evento de intoxicación y muerte de dos marineros en la zona de Península de Valdés, Argentina. La presencia del dinoflagelado *Alexandrium tamarense*, su aislamiento y análisis toxicológico permitieron identificarlo como el organismo productor de las mencionadas toxinas. En la actualidad casi todos los ecosistemas costeros de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil están afectados por TPM. A fines de verano de 1992, en la costa uruguaya

se registró la primera floración de *Gymnodinium catenatum*, otra especie responsable de TPM. Este parece ser un fenómeno recurrente que por mecanismos de transporte se detecta ocasionalmente hasta la latitud de Mar del Plata. En ese mismo verano, otra especie productora de TPM, *A. catenella* produjo en la región del canal de Beagle un brote de toxicidad de una magnitud no conocida en otras partes del mundo ( $127 \times 10^3$  lg STX eq.)

Aunque varias especies de diatomeas del género *Pseudonitzschia*, potenciales productoras de ácido domoico fueron observadas en la región, el primer brote de TAM fue detectado a mediados de julio de 2000. Los estudios realizados permitieron confirmar que las poblaciones naturales de *Pseudonitzschia australis* contenían cantidades significativas de ácido domoico (TAM). También pudo detectarse la presencia de ácido domoico en mejillones (*Mytilus edulis*) así como en el contenido gastrointestinal y el tejido muscular de la anchoita (*Engraulis anchoita*) de esta región.

En el litoral de Argentina y Uruguay se ha detectado la presencia de varias especies de dinoflagelados del género *Dinophysis* potencialmente productoras de Toxinas Diarreicas de Moluscos (TDM). Además, recientemente se detectó el primer episodio de Intoxicación Diarreica de Moluscos (IDM) por consumo de cholgas colectadas en Golfo Nuevo y Golfo San José. El organismo causal identificado como el dinoflagelado *Prorocentrum lima*, confirmándose la presencia de la toxina dinophysis-3 (DTX-3)

En este trabajo se presenta una revisión del estado actual de la ocurrencia de estos fenómenos en el Mar Argentino.

### **TOXINAS MARINAS. FLORACIONES ALGALES NOCIVAS**

Karin Fulco. Centro Nacional Patagónico (CENPAT, CONICET) Bvard. Brown 3700. Puerto Madryn, Chubut. fitoplan@cenpat.edu.ar

Las floraciones de microalgas nocivas constituyen un problema económico y sanitario que afecta en forma recurrente al litoral marítimo argentino. La mayoría de las especies productoras de toxinas son dinoflagelados planctónicos, microalgas capaces de realizar fotosíntesis que constituyen la base de cadenas alimentarias marinas. Los organismos filtradores (principalmente bivalvos) concentran estas toxinas y las transmiten a los eslabones superiores de las cadenas alimentarias (peces, aves y mamíferos marinos, ser humano). En el mar Argentino se han detectado tres grupos de toxinas capaces de afectar al ser humano:

- Toxinas paralizantes (VPM o PSP): producidas por los dinoflagelados *Alexandrium* spp y *Gymnodinium catenatum*, afectan a prácticamente todo el litoral marítimo argentino. Se conocen al menos 26 derivados de la saxitoxina (STX): Neosaxitoxina (NeoSTX), gonyaulatoxinas (GTX), decarbamoilgonyaulatoxinas (dcGTX) y N-sulfocarbamoiltoxininas (C). Provocan parálisis muscular

debido al bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes.

- Toxina amnésica (VAM o ASP): es causada por diatomeas del género *Pseudonitzschia*. Fue detectada en la zona de Mar del Plata, aunque hasta el momento no se registraron intoxicaciones en seres humanos. Es un aminoácido secundario, el ácido domoico (DA), que actúa como agonista de los receptores de glutamato, principalmente en la región del hipocampo. Causa daño neurológico con pérdida de la memoria.

- Toxinas diarreicas (VDM o DSP): asociado con el dinoflagelado *Prorocentrum lima*, productor de ácido okadaico (OA) y dinophysistoxina (DTX). Se registraron episodios de intoxicación en la zona norte de Chubut. Actúa inhibiendo la proteína fosfatasa, provocando diarreas. También es promotor de tumores.

En el Laboratorio de Fitoplancton del CENPAT (CONICET) se realizan estudios para determinar los mecanismos que conducen a la iniciación, persistencia y declinación de las floraciones de microalgas nocivas.

### **TOXINAS DE FLORACIONES ALGALES, CIANOTOXINAS**

Diana González. Toxicología y Química Legal, Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera, San Luis. TE: 02652 43789 int. 112. e-mail: dgonza@unsl.edu.ar

La problemática del agua es un tema estratégico para el bienestar de nuestros pueblos como estratégico es el recurso. Está íntimamente vinculada a las necesidades básicas y, junto con la alimentación y la salud, se presenta como uno de los problemas de mayor complejidad e importancia. Dentro de los criterios de calidad del agua, que incluye características bacteriológicas, químicas y radiológicas, se suma hoy el aspecto relacionado a la formación de "blooms", floraciones o crecimiento desmedido de cianobacterias con la posibilidad de producción de compuestos químicos que alteran la calidad del agua y más importante aun la producción de toxinas, dermatotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxinas, que representan un serio riesgo para la salud humana y animal. Estas cianobacterias conocidas también como algas verde-azuladas son algas microscópicas que crecen con suma facilidad en reservorios de agua con altos contenidos de nutrientes producto de la actividad humana, efluentes industriales y cloacales, residuos domiciliarios, etc., que pueden observarse particularmente en las orillas como masas de espuma verdosa.

### **MESA REDONDA: MICOTOXINAS**

Coordina: Ana María Di Giulio (SENASA)

### **REGLAMENTACIONES SOBRE NIVELES DE MICOTOXINAS. ESTADO ACTUAL**

Farnochi María Cecilia. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Univ. Nac. de Río Cuarto-Río Cuarto-Córdoba Argentina. TE: 54-358-4676429 Email rnochi@exa.unrc.edu.ar

La seguridad de los alimentos y el establecimiento de regulaciones para preservar la inocuidad de los mismos constituyen una actividad compleja y son muchos los factores a considerar al momento de tomar decisiones. Las micotoxinas se encuentran presentes en los alimentos como contaminantes naturales, motivo por el cual la salud pública se enfrenta a un gran problema, en particular para aquellas micotoxinas carcinogénicas, las cuales deberían excluirse de los alimentos tanto como sea posible. A partir del descubrimiento de las aflatoxinas, con el objetivo de proteger la salud del consumidor, han sido implementadas regulaciones en varios países del mundo para diferentes micotoxinas tales como: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, zearalenona entre otras. La FAO ha jugado un rol importante en la difusión de información sobre regulaciones internacionales y se ha podido constatar que el número de países con regulaciones se ha incrementado en las últimas décadas de un modo considerable: en 1981 era de 31, en 1987 ascendió a 56, en 1999 a 77 y en la actualidad 99 países poseen regulaciones al menos para algún tipo de micotoxina, además nuevas regulaciones se van incorporando y se espera que para el año 2010 el número alcance a 120. Esto refleja la toma de conciencia por parte de los gobiernos acerca de los efectos potenciales de las micotoxinas sobre la salud humana y animal como también su implicancia sobre el comercio internacional.

### **MICOTOXINAS**

Inés SOLÁ. (INTI)

En 2003 se realizó en el JIFSAN, Maryland, un WORKSHOP INTERNACIONAL EN MICOTOXINAS "En razón de armonizar el entrenamiento en micotoxinas mundialmente" con los siguientes objetivos: protección de riesgos para la salud, accesibilidad a entrenamiento en métodos de detección, conocimiento de las condiciones que llevan a la formación de micotoxinas, regulación y programas de monitoreo, cumplimiento con estándares de comercio internacional, proveer oportunidades para las naciones desafiadas económicamente, entrenamiento de expertos regionales, establecimiento de actividades educativas colaborativas, desarrollando un programa mundial de aprendizaje a distancia, preparando materiales educativos

Se aconsejó a los países: desarrollar sistemas integrados sustentables, de inocuidad alimentaria para la reducción de riesgo para la salud a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor. Idealmente, los programas de relevamiento y monitoreo deberían ser incorporados dentro de sistemas integrados de inocuidad alimentaria. Incrementar la coordinación de esfuerzos internacionales para desarrollar programas de relevamiento y monitoreo sustentables, capacidad de laboratorios, sistemas de

Certificación, facilidades de inspección, fortaleza en negociación, armonizar estándares para facilitar el comercio.

Riesgo de salud asociado con contaminación con micotoxinas: las micotoxinas son metabolitos de hongos, los cuales interactúan con las células y reducen su habilidad para sobrevivir, crecer, o a veces llevar a cabo sus funciones normales.

Definición alternativa – metabolitos secundarios tóxicos que causan enfermedad si son ingeridos en cantidades suficientemente altas sobre un período de tiempo suficientemente largo.

Se conocen más de 300 micotoxinas, sin embargo, el número que posee un riesgo importante para la salud de humanos y animales es limitado.

1. Premisa Central de la toxicología – “la toxicidad depende de la dosis”. 2. Los estudios en laboratorio no mimetizan los de exposición en el campo. 3. La toxicidad potencial y la toxicidad confirmada en el campo no son iguales. 4. Sin embargo existen grupos de alto riesgo, factores de susceptibilidad, etc.

Cuáles micotoxinas serán peligrosas: 1. Aquellas para las cuales la exposición es alta! por ejemplo presencia en alimentos consumidos en grandes cantidades. 2. Aquellas que son muy tóxicas! por ejemplo tricotecenos macrocíclicos. 3. Aquellas que causan enfermedades en humanos o animales, por ejemplo AFB1, FB1, DON. 4. Aquellas que tienen mecanismos que podrían modificar la respuesta a enfermedades; por ejemplo AFB1, FB1

**AFLATOXINAS:** Causa enfermedades en animales de granja en todo el mundo y enfermedades en humanos. En animales de granja la reducción de la ganancia de peso es uno de los problemas más comunes. Hepatotóxica en todas las especies testeadas. Carcinógeno hepático en roedores, truchas, humanos (Grupo 1). Inmunosupresiva en muchas especies. Su toxicidad se potencia por endotoxinas. La carcinogenicidad hepática en humanos es agravada por los virus de hepatitis B o C.

**ACIDO CICLOPIAZÓNICO:** Co-ocurre con aflatoxina en maíz y maní. Agudamente tóxico. Afecta el tracto GI, hígado, bazo, riñón, páncreas, glándulas salivares, y músculo. Podría haber estado involucrado en la “enfermedad X de los pavos”. Inhibidor específico del transporte de calcio en retículo endoplásmico y sarcoplásmico ATPase un posible mecanismo de promoción tumoral.

**OCRATOXINA A:** Causa de nefropatías en porcinos y aves de corral (JECFA PTWI = 100 ng/kg bw). Carcinógeno renal en ratón (Grupo 2B). Se la encuentra en sangre humana en Europa y África. Envuelta en la nefropatía endémica de los Balcanes. Mecanismo= disrupción del metabolismo de la fenilalanina.

**FUMONISINAS:** Hepatotóxica en todas las especies testeadas. Nefrotóxica en muchas (JECFA PMTDI 2 ug/kg bw). Toxicidad aguda, para caballos (ELEM) y cerdos (PPE). Carcinogénica para ratas y ratón (Grupo 2B). Promueve agudamente

la iniciación del cáncer de hígado cuando co-ocurre con AFB1. Sospecha de estar envuelta en cáncer y NTD (Defectos del Tubo Neural) en humanos. Mecanismo = disrupción del metabolismo de lípidos

**DEOXINIVALENOL:** Bajas dosis causan vómitos en cerdos, por eso DON es también conocido como vomitoxina. Altas dosis causan rechazo del alimento (JECFA DON PMTDI = 1 ug/kg bw; T-2/HT-2 PMTDI = 60 ng/kg bw). Causa elevada IgA, conduciendo a nefropatías IgA. Asociado con brotes de enfermedades en humanos manifestadas por problemas GI. Inhibe la síntesis de proteínas; supresor del sistema inmune. En ratón, causa superinducción de citoquinas

**Nefropatía Ig A:** Forma más común de glomerulonefritis. 20 a 40% de los pacientes desarrollan estado final de falla renal dentro de 20 años. Podría el DON estar involucrado en la nefropatía humana IgA?. Alteración de expresión de citoquina precede a la inhibición de síntesis de proteína por DON.

**ZEARALENONA:** Micotoxina Estrogénica que co-ocurre con DON. Como el DON, es asociada comúnmente con problemas de performance animal, especialmente problemas reproductivos en cerdos. Actúa por binding con el receptor de estradiol. Un metabolito (zearalanol) ha estado siendo usado como un promotor del crecimiento en cerdos y se ha sugerido que estaría involucrado en brotes de desarrollo precoz en humanos. Es posible la exposición a micotoxinas por otras vías o rutas además de los alimentos. Existe un potencial de interacción entre micotoxinas y otras toxinas o agentes infecciosos. El número total de micotoxinas es desconocido.

¿Estará subestimado el riesgo por micotoxinas para la salud humana y animal?

## **EVALUACIÓN DEL RIESGO DE EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS A TRAVÉS DEL USO DE BIOMARCADORES. PREVENCIÓN DE MICOTOXICOSIS**

Chulze, Sofia Noemi.

Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto-Río Cuarto-Córdoba Argentina. TE: 54-358-4676429 E-mail: schulze@exa.unrc.edu.ar

Los productos agrícolas y subproductos derivados destinados al consumo humano y animal son susceptibles de contaminación con micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por especies fúngicas principalmente pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*.

El consumo de productos contaminados con micotoxinas producen efectos tóxicos en animales y en el hombre que varían dependiendo de los niveles consumidos y de las especies afectadas. La disponibilidad de biomarcadores de exposición a micotoxinas permite realizar estudios para lograr

una estimación más exacta del riesgo de exposición asociado con el consumo de alimentos contaminados, evaluar procesos de descontaminación y el uso de adsorbentes para disminuir la disponibilidad de las micotoxinas en el tracto digestivo.

Se han realizado estudios epidemiológicos para determinar la exposición a aflatoxinas, midiendo la formación de aductos de aflatoxinas con albuminas y DNA. Se ha determinado ocratoxina en suero humano para estudiar la etiología de la nefropatía endémica de los Balcanes y tumores en el tracto urinario.

Las fumonisinas representan un riesgo para la salud humana y animal, por su toxicidad especie-específica, potencial carcinogenicidad y la incidencia en maíz y productos a base de maíz. La relación esfingarina/esfingosina ha sido propuesto como un biomarcador de exposición a dichas micotoxinas.

Entre los tricotecenos, deoxinivalenol ha sido detectado en distintos cereales, trigo, avena, cebada, maíz. Se ha propuesto la detección de derivados glucuronidos de DON en orina como un biomarcador de exposición a deoxinivalenol.

## **MESA REDONDA: TOXINAS BACTERIANAS**

Coordina: Ricardo SOBOL. UADE

### **AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS**

María Isabel YEANNES. Investigador de CONICET. Docente-investigador UNMDP. Preservación y Calidad de Alimentos. Departamento de Química. FCEyN. UNMDP. Funes 3350. 7600 Mar del Plata. TE: 54 223 4756167. FAX: 54 223 475 3150. E-mail: myeannes@mdp.edu.ar

Las aminas biógenas han sido asociadas con una amplia variedad de brotes de origen alimentario alrededor del mundo. Son compuestos biológicamente y farmacológicamente caracterizados por la presencia de un grupo amino que pueden estar presentes en los alimentos y que pueden tener diferentes efectos sobre la salud del consumidor. Se producen por descarboxilación de los aminoácidos libres mediado por diferentes microorganismos (bacterias, hongos). Es muy conocida la incidencia de la histamina en estos brotes y su implicancia en los productos pesqueros, pero se deben considerar otras aminas como la putrescina, cadaverina, espermina, espermidina que pueden estar presentes en los alimentos y que actúan como potenciadores de la histamina, de allí la importancia de considerar las aminas biógenas y no solamente histamina. Asimismo se considera a los productos pesqueros como los que pueden presentar este tipo de problemas sanitarios, pero las mismas pueden encontrarse en otros alimentos con alta concentración de aminoácidos libres, con microorganismos con actividad descarboxilantes y condiciones del medio adecuadas para el crecimiento de los mismos. Las estadísticas a nivel internacional ubican a los productos pesque-

ros como los primeros en importancia, pero se pueden encontrar en productos lácteos, fiambres, vinos, cerveza, etc.

Generalmente se asocia la presencia de aminas biógenas, en especial histamina, con procesos de deterioro, pero estas se pueden encontrar presentes en productos fermentados o madurados en alimentos de alto contenido proteico sin estar indicando deterioro. Los productos de la pesca fermentados o madurados pueden exhibir altas concentraciones de las mismas, al igual que quesos, chacinados, salsa de soja, etc. En estos casos es importante el estudio de la flora descarboxilante a fin de poder controlar biotecnológicamente el proceso sin llegar a superar los límites sanitarios.

### **BOTULISMO EN ARGENTINA**

Rafael Alfredo Fernández. Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Casilla de Correo 33, Mendoza, Argentina. E-mail: rfernand@fcm.uncu.edu.ar

El botulismo es una enfermedad neurológica de alta letalidad producida por la neurotoxina botulínica (NTBo) elaborada por diferentes especies de clostridios (*Clostridium botulinum*, *C. argentinense*, *C. baratii*, *C. butyricum*). Hasta hoy, se han identificado 7 serotipos de toxina (A, B, C, D, E, F, G) y 4 subtipos (Af, Ab, Ba, Bf). Se reconocen dos formas fisiopatogénicas de la enfermedad: la intoxicación, que incluye el botulismo por alimentos (BA), el iatrogénico (Bla) y el intencional (BIn); y la toxiinfección, con el botulismo por heridas (BH), del lactante (BL) y el críptico (BC). En todos los casos la enfermedad se produce por acción principalmente periférica de la NTBo a nivel de la placa mioneural donde inhibe la liberación de acetilcolina y produce parálisis flácida simétrica descendente que puede llevar a la muerte por paro respiratorio. El BA, intoxicación clásica, conocido desde hace siglos, se debe a la ingesta de toxina botulínica preformada en un alimento, contaminado con esporas de clostridios productores de NTBo (CPTB) y elaborado y conservado de manera inadecuada. En el BH (EE.UU., 1942) y el BL (EE.UU., 1976) la NTBo se produce "in situ", luego de la colonización de CPTB en una herida infectada o el intestino de lactantes (menores de 1 año de vida, con mayor frecuencia en menores de 3 meses). El BC fue definido por el CDC (EE.UU., 1978) en pacientes con síndrome botulínico y diagnóstico de laboratorio, que no presentaban antecedentes de ingesta de alimento sospechoso o herida. El Bla (en los '90) se deriva de la utilización farmacológica de las NTBo en individuos que padecen distintos tipos de distonías musculares y en cosmética.

El origen de la contaminación es, quizá en todos los casos, el suelo, principal reservorio de las esporas de CPTB. En nuestro país se estudiaron 2.009 muestras con 472 (23,5%) positivas para CPTB con una multiplicidad de serotipos no detectada en otras partes del mundo (A 56,7%, B

15,3%, F 3,8%, G 0,4%, Af 3,6%, A+B 3,0%, A+F 0,2%, B+F 0,2%, no identificados 16,6%).

En Argentina se han producido hasta 2004, 86 brotes de BA, con 278 casos y una letalidad de 17,1% en los últimos 10 años. Causados 53,6% por alimentos de origen vegetal, 10,5% de origen animal y 35,9% mixtos; 81,7% de elaboración casera y 18,3% industrial.

Se han denunciado 4 casos de BH, y 4 casos de botulismo en mayores de 1 año sin antecedentes de ingesta de alimentos tóxicos o heridas (¿criptico?).

Desde 1982 se han registrado 336 casos de BL (Capital Federal y provincia de Buenos Aires 95, Mendoza 87, Neuquén 35, Río Negro 29, San Luis 26, La Pampa 14, Córdoba 13, San Juan 10, Chubut 8, Tucumán 4, Catamarca 3, Salta 3, Jujuy 2, Corrientes 1, Entre Ríos 1, La Rioja, Santiago del Estero 1, Tierra del Fuego 1, Misiones 1, Santa Fe 1).

Actualmente la NTBo es utilizada con fines terapéuticos en distintas distonias musculares espasmódicas, entre otras: estrabismo, blefaroespasmó, espasmo hemifacial, disfonía espasmódica, torticolis espasmódica, etc. y posteriormente en cosmética para tratamiento del envejecimiento facial como alternativa no quirúrgica para tratamiento de las arrugas.

Causa preocupación mundial la utilización de la NTBo como arma biológica, 1 g de toxina aerosolizada es potencialmente letal para 1,5 millones de personas, pudiendo diseminarse más del 60% de la dosis a la población blanco utilizando como vía táctica misiles balísticos o spray aeronáutico. Esta es la causa de un relativo desabastecimiento mundial de suero terapéutico antibotulínico.

### **ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA**

Isabel CHINEN. Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, Instituto de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563, Buenos Aires (1281). E-mail: ichinen@anlis.gov.ar

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente relacionado a Enfermedades Transmitidas por Alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea con o sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Los principales mecanismos de diseminación de STEC son el consumo de alimentos contaminados, el contacto directo con animales y la transmisión persona-persona. En Argentina, el SUH es un importante problema endémico de Salud Pública. La enfermedad constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica y es además responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. En el año 2004, la tasa de incidencia fue de 12,5 casos por 100,000 niños < 5 de años. Esta tasa es 10 veces más alta comparada con la que presentan los países industrializados.

STEC es el principal agente etiológico de SUH en Argentina. La toxina Shiga (Stx) es el principal factor de virulencia en la patogénesis de las enfermedades asociadas a STEC. Existen descriptos 2 tipos de Stx, Stx1 y Stx2, con similar actividad tóxica, pero antigénicamente distintas y con mecanismos de regulación diferentes. Sus genes solo comparten el 58% de la secuencia. El grupo de las toxinas Stx1 es relativamente homogéneo aunque recientemente se ha descrito una variante. El grupo de las toxinas Stx2 en cambio presenta numerosas variantes, entre ellas Stx2c (Stx2vh-a y Stx2vh-b), Stx2e, Stx2d y Stx2f. Varios sistemas de PCR para la detección de los genes stx han sido diseñados, tanto para diagnóstico como para subtipificación. Las cepas aisladas en nuestro país de origen humano, animal y de alimentos son fundamentalmente productoras de Stx2. La intimina y la enterohemolisina constituyen factores de virulencia accesorios involucrados en la patogénesis. Es fundamental contar con un sistema de vigilancia que permita monitorear la situación epidemiológica en nuestro país a fin de promover las estrategias de prevención y control de este patógeno.

### **MESA REDONDA: CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES**

Coordina: Graciela Edith DIAZ (UADE)

#### **PCBs EN SÁBALOS DE LA CUENCA DEL RÍO DE LA PLATA: TOXICIDAD CAUSADA POR CONGÉNERES ESPECÍFICOS**

Cappelletti, N; Colombo, J. C. Laboratorio de Química Ambiental y Biogeoquímica. FCNyM. UNLP. Av. Calchaquí Km 23.5 (1888). Florencio Varela. B. A. Argentina. E-mail: lacab@intervar.com.ar

Debido a su hábito detritívoro, el sábalo maximiza la ingesta de materia orgánica, incluyendo aportes antrópicos lo cual posibilita la bioacumulación de contaminantes hidrófobos como los PCBs. El análisis de congéneres de PCBs con estructura y toxicología similar a las dioxinas (mono y no orto sustituidos, "DLPCB"), permitió calcular la toxicidad relativa (TEQ) presente en los tejidos de estos peces. A partir de la concentración TEQ se estableció el consumo tolerable aplicando las normativas y recomendaciones internacionales (Consumo diario recomendado: WHO TDI). A partir de este esquema, se determinaron concentraciones TEQ en sábalos colectados en diferentes localidades sobre el Río de La Plata y Paraná. Los valores TEQ registrados en sábalos colectados sobre el Río de La Plata oscilaron entre 0.35-185 pgTEQ g-1, observando los valores más elevados en el área Berazategui-Quilmes (2-185 pgTEQ g-1) lo cual refleja los aportes de los efluentes como ruta crítica de contaminación. En los sábalos provenientes del Río Paraná se encontró mayor variabilidad de concentraciones, oscilando entre 0.008-121 pgTEQ g-1, lo cual muestra que las migraciones de estos peces constituyen un meca-

nismo importante de difusión de estos contaminantes. Considerando los niveles de WHO TDI de 4  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  los valores hallados indican un consumo tolerable que puede oscilar entre 0.02 a 11  $\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  en el Río de La Plata y de 0.02 a 509  $\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  en sábalos colectados en el Paraná.

### **PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS EN ALIMENTOS INFANTILES**

Villaamil Lepori, E.C.; Ridolfi, A.; Álvarez, G.; Rodríguez Girault, M.E.; Mirson, D.; Ravenna, A.  
Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956- Piso 7° (1113) Buenos Aires- Argentina -Tel/fax: (++54-11) 4964-8283/4 e-mail: evillaam@ffyba.uba.ar

Los plaguicidas organoclorados (POC) se utilizan extensivamente en la agricultura, en el área forestal y en la salud pública para el control de plagas, sufren una muy escasa y lenta degradación y su consecuencia es la alta persistencia en el medio ambiente y su acumulación en la cadena alimentaria.

Los niños están expuestos a combinaciones de plaguicidas aportados por los alimentos que presentan probables riesgos para la salud a largo plazo. Diversos estudios señalan la presencia en los alimentos de POC, con significativa frecuencia. Exposiciones prenatales y de niños pequeños, a estas sustancias, se relacionan con una deficiencia en el desarrollo neurológico y bajo peso corporal.

En Argentina se hallaron niveles elevados del Heptacloro y su metabolito en productos de origen animal y no se hallaron datos de residuos de POC en dietas infantiles.

El consumo de leche y productos lácteos es elevado en lactantes y niños pequeños, y en base a los antecedentes existentes, se estima que pueda superarse las IDAs recomendadas para algunos de ellos. Por tal razón se decidió investigar la presencia de residuos de POC en alimentos recomendados e indicados para lactantes y niños pequeños y calcular la ingesta diaria estimada de POC en estos alimentos y establecer su correlación con la ingesta diaria admisible (IDA)

Se analizaron un total de 101 muestras de leches y productos lácteos recomendados para lactantes de las cuales 50 muestras fueron leches maternizadas y 51 yogures y postres lácteos obtenidos en el mercado local. Para su extracción se utilizó el método de la FAO/OMS (1994) y para su investigación cromatográfica por Cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones. La evaluación de riesgo se efectuó considerando grupos de plaguicidas de acuerdo a FAO.

En las leches maternizadas el plaguicida que se halló con mayor frecuencia fue el Heptacloro más su epóxido, 57% de las muestras, le sigue en importancia la suma de Hexaclorociclohexanos (-HCH, -HCH y %o-HCH) el 54%, el DDT (op'DDE, pp'DDE, op'DDT y pp' DDT) 32% y las Aldrin

(Aldrin y Dieldrin) 32%.

El Lindano fue el plaguicida hallado con mayor concentración máxima en leche (0,125  $\mu\text{g/ml}$ ), le sigue en importancia el grupo del Heptacloro (0,074  $\mu\text{g/ml}$ ).

Sobrepasan la IDA, teniendo en cuenta las concentraciones máximas, los lactantes de 3 Kg de peso corporal y una ingesta diaria de 450 ml de leche, los siguientes grupos de POC: Heptacloro 111 veces, Aldrin 3 veces y Endrin 2,3 veces. El Lindano contribuye solo con el 0,2 veces la IDA y el DDT 0,004 veces.

Considerándose las concentraciones medias y medianas de los POC en leches, las ingestas estimadas decaen por debajo de las IDAs recomendadas, no siendo así en el caso del Heptacloro ya que supera la IDA 18 y 13 veces respectivamente. Esto último indica un probable alto riesgo de exposición de los lactantes al Heptacloro y su epóxido.

En los productos lácteos los únicos POC que aportan cantidades que superan la IDA fueron el Heptacloro y el Endrin. Considerando la concentración máxima hallada, el Heptacloro supera la IDA 6 veces y el Endrin 3 veces. Para las concentraciones medias y medianas, solo el Heptacloro aporta porcentajes considerables: 81% y 60% respectivamente.

### **MESA REDONDA: RIESGO TOXICOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS**

Coordina: Teresa M. FONOVIH. (Escuela de Ciencia y Tecnología, UNSAM)

### **ÁCIDOS GRASOS TRANS Y CLA. EFECTO SOBRE LA SALUD HUMANA**

Claudio BERNAL. Investigador Adjunto CONICET. Profesor Asociado Bromatología y Nutrición. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria Paraje "El Pozo" s/n. CC 242. (3000) Santa Fe

Durante los últimos años, han sido objeto de gran atención los efectos bioquímico-nutricionales de los ácidos grasos (AG) isoméricos (geométricos y/o posicionales).

Los isómeros geométricos trans de los AG (AG-t) presentan una conformación espacial lineal que hacen que, en ciertos aspectos químicos y biológicos, estos isómeros se asemejen a los AG saturados. Los AG-t son sintetizados por las bacterias del rúmen de animales poligástricos, no obstante, los aceites parcialmente hidrogenados son la mayor contribución dietaria de los mismos. El contenido de AG-t en los alimentos es muy variado pudiendo llegar a máximos del 50% de los AG totales en margarinas, shortenings y grasas de panificación. Por otro lado, los Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) son AG dienoicos derivados del ácido linoleico, que se caracterizan por modificaciones isoméricas posicionales (9,11 ó 10,12) y geométricas (cis/trans) de sus dobles enlaces. Los mismos son generados por las bacterias del

rúmen y colónicas, por ello se encuentran naturalmente en la carne de rumiantes, leche y productos lácteos derivados, y también pueden ser formados industrialmente. Existen previsiblemente 8 isómeros CLA, pero el c9,t11-CLA y el t10,c12-CLA son los más importantes.

El consumo de isómeros de AG puede potencialmente tener un elevado impacto sobre la salud y sus efectos pueden ser muy diferentes dependiendo del tipo de isómero que se esté considerando. Un alto consumo de AG-t aumenta el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), reduce el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y aumenta los niveles de Lipoproteína a (Lp-a), incrementando la incidencia de enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis. También los AG-t pueden interferir con algunas etapas del metabolismo del Ácido Linoleico y Araquidónico pudiendo conducir a una inhibición de la síntesis de PUFAs y de este modo interferir en la formación de eicosanoides y alterar la composición y propiedades biológicas de membranas. A nivel experimental, numerosas alteraciones han sido reportadas, entre ellas, en un modelo dietario experimental para el estudio específico de los efectos de los AG-t, hemos demostrado hipertrigliceridemia con acúmulo de triglicéridos en hígado, alteraciones en la digestibilidad, en la utilización energética de la grasa dietaria y en el metabolismo de la glucosa y lípidos. Mientras numerosas acciones deletéreas han sido atribuidos a los AG-t, efectos positivos y negativos han sido reportados sobre los CLA.

Los CLA, a nivel experimental, han mostrado efectos preventivos sobre la carcinogénesis y acciones benéficas sobre el metabolismo glucídico en animales diabéticos. Además, poseen capacidad para modular el metabolismo lipídico actuando como hipolipemiantes, reduciendo el contenido de grasa corporal e incrementando la masa corporal magra. Por estos atributos, han sido comercialmente utilizados para su incorporación en la industria alimentaria y farmacéutica como suplementos dietarios y ayudas ergogénicas. Sin embargo, ha sido demostrado que los CLA poseen diversos efectos adversos, como apoptosis del adipocito, inducción de resistencia insulínica asociado a hiperinsulinemia, hepatomegalia y esteatosis. A nivel humano, muy escasos estudios fueron reportados sobre los efectos de los CLA.

Mayores investigaciones deben ser realizadas para esclarecer los efectos positivos y/o negativos de los isómeros de AG, no obstante es importante limitar su indiscriminado uso a los fines de prevenir los efectos claramente conocidos sobre la salud humana.

### **PROBABLE METABOLISMO NO OXIDATIVO DE INDIGOTINA (132) EN UN MODELO ANIMAL**

Teresa M. FONOVIK de SCHROEDER. Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Gral. San Martín. Avda.

Gral. Paz entre Albarellos y Constituyentes (INTI) edificio 23. (1650) San Martín. Buenos Aires. Email: tfonovic@unsam.edu.ar

El uso de colorantes alimentarios se ha ido restringiendo en los últimos años de manera desigual en diferentes países, sobre la base de pocos estudios de toxicidad, los que en ocasiones han mostrado resultados disímiles. Recientemente se ha demostrado la conjugación de diferentes sustancias (como el etanol y la anilina) con lípidos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la probable conjugación del colorante indigotina (132) con lípidos en el hígado de un modelo animal: rata Wistar, luego de inyección intravenosa del mismo en solución salina. Diferentes estudios cromatográficos y fisicoquímicos de extractos lipídicos de hígado en los que se encontró el colorante y ensayos realizados "in vitro" con extractos de hígado, confirman que el mismo sufrió modificaciones en su solubilidad a su paso por este órgano. Estos resultados nos permiten sugerir su probable conjugación con fosfolípidos, aunque no podemos descartar que el colorante pueda también ser sustrato para otras reacciones enzimáticas que lleven por ejemplo a la pérdida de grupos sulfonato, ya que ambos tipos de modificaciones conducen a un incremento de su solubilidad en lípidos. La administración de una dosis única del colorante por vía oral demostró que el mismo se incorpora rápidamente en el hígado. Los resultados del presente estudio indican la necesidad de continuar esta línea de investigación. El siguiente objetivo será el estudio del metabolismo de indigotina, cuando se administra por vía oral junto con el alimento, durante períodos prolongados y en dosis similares a las presentes en los alimentos que consume la población humana.

### **MIGRACION DE SUSTANCIAS DE LOS ENVASES A LOS ALIMENTOS**

Alejandro ARIOSTI – INTI-Plásticos

La migración de componentes y residuos de los materiales de envase a los alimentos es un fenómeno cuya evaluación y control es de la mayor importancia, ya que produce la incorporación a los mismos de sustancias no deseadas. La migración debe estar acotada, para que no genere cambios indeseables de la composición del alimento, así como de sus características sensoriales, ni sea un riesgo para la salud del consumidor. La migración no se produce por el mismo mecanismo en todos los materiales de envase. En los materiales poliméricos, principalmente los plásticos, existe una transferencia de masa por difusión a través de la matriz polimérica hacia el alimento. El fenómeno inverso de la migración, la sorción de componentes del alimento en la pared del envase plástico, puede traer cambios indeseados en el producto envasado, y su estudio es de especial interés en los envases plásticos retornables.

La migración, tanto total como específica de algún componente, es uno de los aspectos de la evaluación de la aptitud sanitaria de un envase ali-



mentario, cualquiera sea el material con que está fabricado. Sin embargo hay otros factores a tener en cuenta: la inclusión de todos los componentes del material en listas positivas, el contenido máximo de monómeros y aditivos en la pared del envase, la aptitud sanitaria de los pigmentos utilizados en su coloración, y las posibles variaciones de caracteres sensoriales de los alimentos.

## RESÚMENES DE LA SESIÓN DE PÓSTERS

### 1-STAPHYLOCOCCUS AUREUS: CAPACIDAD ENTEROTOXIGÉNICA DE CEPAS AISLADAS DE ALIMENTOS Y MANOS DE MANIPULADORES

Staphylococcus aureus: enterotoxigenicity of strains isolated from foods and foodservice personnel hands

Gubby1 L., Galanternik1 L., Escolar1 M., Cabrera Durango2 J., Degrossi3 C.

1 Laboratorio Lamyc, 2 INAL-ANMAT, 3 Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina – Billinghamurst 1237, Bs. As., Argentina. e-mail: lamyc@pccp.com.ar

Se realizó un estudio prospectivo con el fin de investigar la producción de enterotoxinas (ET) en cepas de Staphylococcus aureus (SA) aisladas de alimentos listos para consumir y de manos de manipuladores, tomadas de comedores fabriles y locales de expendio de comidas de ciudad de Buenos Aires y alrededores desde el 1/5/2002 al 15/11/2003. Se investigó la presencia de SA en 439 alimentos y 336 hisopados de manos (agar Baird Parker, Gram, catalasa, coagulasa, DNAsa y API STAPH) y utilizó el sistema miniVIDAS (bioMérieux) para la detección de ET. Se aislaron 59 cepas de SA de alimentos y 33 de hisopados de manos, coagulasa y DNAsa positivas. En 33 cepas (de 19 alimentos y 14 hisopados) se estudió la capacidad de producir ET, siendo 20 positivas (60,6 %). De las aisladas de hisopados, 9 (64,3%) fueron enterotoxigénicas, siendo 5 de estos aislamientos de manipuladores con lesiones en manos. Un total de 11/19 cepas de alimentos (57,9%) fueron enterotoxigénicas, con 3 aislamientos de mozzarella en envase cerrado. La alta proporción de cepas enterotoxigénicas resalta la importancia de la capacitación de los manipuladores en Buenas Prácticas y principalmente hábitos de higiene para prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos por este microorganismo

### 2-ARSÉNICO, PLOMO Y NÍQUEL EN AGUAS SUBTERRÁNEAS DE LA REGIÓN CENTRO-OESTE DE LA PROVINCIA DEL CHACO

Arsenic, lead and nickel in groundwater of the central-west region of the Province of Chaco

Blanes, P. S.; Benítez, M. E.; Giménez, M. C.

Facultad de Agroindustrias. UNNE. Cdte. Fernández 755 (3700) Pcia. R. S. Peña. Chaco. Argentina. Tel./Fax. (03732) 420137. e-mail: patriciablanes@hotmail.com

En publicaciones previas hemos reportado la presencia de arsénico, en aguas subterráneas de consumo en el centro-chaqueño, en concentraciones que superan el valor guía admitido por el Código Alimentario Argentino.

En este trabajo se determinan niveles de As, Pb y Ni en aguas subterráneas del centro-oeste de la Provincia y se evalúa la posible correlación entre dichos metales.

El análisis de arsénico se realizó por EAA con generación de hidruro; plomo y níquel por EAA previa quelación y extracción con APDC/ MIBK. [APHA, AWWA, WFF, (1992)].

El 81.4% de las muestras sobrepasó los 0.01 mg.L-1 de As recomendados por la OMS y el 32.2% superó los 0.05 mg.L-1 establecidos por el C.A.A. (máx: 0.25 mg.L-1, media: 0.05 mg.L-1; n= 59). El contenido de plomo (media: 0.03 mg.L-1; n= 38) fue inferior a 0.05 mg.L-1 (C.A.A.) pero el 81.6% excedió los 0.01 mg.L-1 recomendados por la OMS. El 89% de las muestras exhibe niveles de níquel inferiores a 0.02 mg.L-1 admitidos por la OMS (media: 0.01 mg.L-1; n= 27).

Los valores de correlación fueron muy bajos (Pb-As: r= 0.13; Ni-As: r= 0.28, p-valor > 0.05), por lo tanto no se puede afirmar que exista correlación significativa entre los niveles de As, Pb y Ni en las muestras analizadas.

### 3- ACUMULACION Y DISTRIBUCION DE CADMIO Y PLOMO EN LA ALMEJA ANTÁRTICA *Laternula elliptica*

Accumulation and distribution of cadmium and lead in the Antarctic clam *Laternula elliptica*  
Vodopivec, C.1; Curtosi, A.1; Marrero, J.2; Smichowski, P.2; Piñeiro, A.3; Villaamil Lepori, E.C.3

1 Instituto Antártico Argentino, Cerrito 1248 (1010) CABA, Tel /Fax: E-mail: quimica@dna.gov.ar. 2 Comisión Nacional de Energía Atómica, San Martín, Bs. As. 3 Cátedra de Toxicología y Química Legal – FFyB. UBA

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la acumulación y distribución de Cd y Pb en la almeja antártica *Laternula elliptica*, a fin de valorar su posible empleo como futuro recurso alimenticio. Fueron recolectadas 20 muestras compuestas, por cinco ejemplares c/u, durante el verano austral 2003/04, en los alrededores de la estación Jubany. Los ejemplares fueron agrupados por tallas, disecionados en cuatro tejidos (glándula digestiva (GD), riñón, branquia y músculo) y liofilizados los cuales fueron tratados en horno de micro ondas y cuantificadas por ICP OES. Ambos elementos mostraron concentraciones decrecientes (ug g-1 peso seco) en el siguiente orden: riñón (Cd:  $129 \pm 27$ , Pb:  $68 \pm 35$ ) > GD (Cd:  $11 \pm 3$ , Pb:  $1,4 \pm 0,6$ ) > branquia (Cd:  $2,9 \pm 0,8$ , Pb:  $0,7 \pm 0,3$ ) > músculo ( $1,5 \pm 1,0$ , Pb:  $0,3 \pm 0,05$ ). En todos los casos los contenidos medios de metales resultaron significativamente diferentes entre los tejidos examinados ( $P < 0,01$ ). Las regresiones lineales fueron significativas entre concentración y talla para el Cd en músculo, branquia y GD ( $P < 0,01$ ). Se detecta-

ron marcadas acumulaciones en riñón y GD. Los valores medios en músculo (la porción comestible) son similares a los reportados para especies de áreas templadas y comercializados en el mercado internacional

### 3-ARSENICO TOTAL E INORGANICO EN ALGAS ANTARTICAS

Total and inorganic As in Antarctic algae

Vodopivec, C.1; Curtosi, A.1; Dinoraz Vélez2, Rosa Montoro2, Silvia Fariás3, Patricia Smichowski3

1 Instituto Antártico Argentino, Cerrito 1248 (C1010AAZ) CABA quimica@dna.gov.ar 2 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Laboratorio de Contaminación Metálica. Apartado de Correos 73 46100 Burjassot, España. 3 Comisión Nacional de Energía Atómica, Av. Gral. Paz 1499 (B1650KNA) Bs. As.

El continente antártico presenta una amplia variedad de algas marinas las cuales cumplen un rol crítico en la cadena alimenticia de los ecosistemas costeros. Si bien diferentes estudios han reportado niveles de elementos traza en especies de macroalgas antárticas, la información disponible para As es limitada. En el presente trabajo se determinó la concentración de As total e inorgánicos hallados en nueve especies de macroalgas antárticas (6 feófitas y 3 rodofitas), recolectadas durante el verano austral 2002/03 en las cercanías de la estación Jubany, isla 25 de Mayo, islas Sethland del Sur, Antártida. Las muestras fueron secadas a 80°C hasta peso constante, molidas y digeridas con una mezcla ácida en horno de microondas. El As total fue cuantificado por ICP OES. Para la determinación de As inorgánico se realizó una digestión ácida de la muestra, y tras la extracción del arsénico inorgánico con solventes orgánicos, (retroextracción en medio ácido) se procedió a la cuantificación mediante FI-HG-AAS. Los niveles de As total variaron en un amplio rango con valores mínimos de 5.8 ug g-1 peso seco (ps) en *Myriogramme* sp., y máximos de 151.8 ug g-1 (ps) en *Himantothallus grandifolius*, pero mostrando una clara tendencia dominante donde: As total en feofitas > As total en rodófitas. Los niveles de As inorgánico mostraron menores variaciones detectándose los valores mínimos en *Myriogramme* sp (0.12 ug g-1 ps) y los máximos en *Phaeurus antarcticus* (0.84 ug g-1 ps). Los altos niveles de As total, hallados en algunas especies, parecen estar asociados a las características geoquímicas locales, mientras que los relativamente bajos niveles de As inorgánicos sugieren la existencia de eficientes mecanismos metabólicos para la síntesis de compuestos organoarsenicales.

### 5- TOXINAS CIANOBACTERIANAS: EXPERIENCIAS EN LA PROVINCIA DE SAN LUIS

González, D. M.1, Silva, P. G.1, Echenique, R. O.2 y Silva H.J.1

1.- Universidad Nacional de San Luis, dgonza@unsl.edu.ar, 2.- Universidad Nacional de La Plata.

En este trabajo se presenta una síntesis de estudios realizados con Cyanophyta o algas verde-azuladas considerando la capacidad que poseen de formar blooms o floraciones con producción de metabolitos volátiles, entre ellos Geosmina, que alteran los caracteres organolépticos del agua y fundamentalmente por la capacidad de producir metabolitos de gran importancia toxicológica en el medio ambiente como hepatotoxinas y/o neurotoxinas, de altísimo riesgo para la salud humana y animal.

Se realizaron cultivos y aislamientos en medio Z8, CG/ EM para el análisis de compuestos volátiles y ensayos de toxicidad aguda en ratones.

1.- Resultados obtenidos con muestras ambientales

| Cianobacterias            | Identificación    |                       | Producción de geosmina |                    | Formación de floraciones |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
|                           | Muestra Ambiental | Aislamiento y cultivo | Extracción, CG-EM      | Análisis Sensorial |                          |
| <i>Anabaena sibirica</i>  | +                 | +                     | 16.8(g/ 100 mg)        | +                  | +                        |
| <i>Anabena circinalis</i> | +                 | +                     | ND                     | +                  | +                        |

Los ensayos de toxicidad aguda en ratones con muestras liofilizadas procedentes de las floraciones fueron negativos.

2.- En experiencias realizadas con *Nostoc* sp y *Tolypothrix* sp, dos géneros con aplicaciones biotecnológicas, mediante inyección intraperitoneal de biomasa algal suspendida en solución fisiológica se observaron signos compatibles con apoptosis en hígado.

## COMUNICACIONES LIBRES

### BEBIDAS ENERGIZANTES ¿UN RIESGO PARA LA SALUD?

Edda C. Villaamil Lepori

Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956- Piso 7° (1113) Buenos Aires- Argentina -Tel/fax: (54-11) 4964-8283/4 e-mail: evillaam@ffyba.uba.ar

Son así llamadas las bebidas mezclas embotelladas o enlatadas que contienen extractos de plantas, azúcar y otras sustancias. Los ingredientes principales de la mayoría de estas bebidas son: taurina, cafeína, guaraná, ginseng, glucuronolactona y vitaminas. Algunas poseen minerales, inositol y carnitina, entre otras sustancias.

Suelen consumirlas mayoritariamente los jóvenes, solas o combinadas con alcohol, en discoteca. También está muy extendido su consumo, entre los estudiantes en época de exámenes, para concentrarse mejor y por deportistas.

En Argentina se comercializan más de 10 marcas de estas bebidas, importadas y de elaboración nacional. Están autorizadas por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos

Alimentos y Tecnología Médica) como suplementos dietarios y son de venta libre en la mayor parte del país.

En otros países se las considera refrescos cafeinados, otros incluyen la leyenda con alto contenido de cafeína o los definen como suplementos dietarios. La OMS sugiere que se las considere bebidas estimulantes.

Ciertos países han restringido la venta de estas bebidas o han implementado campañas disuasivas para los usuarios que las combinan con alcohol. Varios municipios y/o provincias de la Argentina han limitado el expendio de estas bebidas y otras pretenden hacerlo.

Mediante la Disposición 3634 /2005 de ANMAT del 8 de julio de 2005 en Argentina la cantidad de cafeína permitida pasó de 35 mg a 20 mg por cada 100 mL.

Un estudio realizado en atletas, a los cuales se les administró bebidas energizantes que contenían taurina, se observó durante el ejercicio una mayor resistencia.

El consumo de las bebidas energizantes aumenta el riesgo de infarto y de trastornos cardiológicos, especialmente cuando se asocia al etanol, ya que pueden causar hipertensión y provocar muerte súbita. La mezcla de cafeína y alcohol provoca cuadros de deshidratación con el consiguiente riesgo cardíaco y renal.

Según diferentes informes técnicos estiman que no se generarían efectos estimulantes sobre el SNC por la interacción entre cafeína y taurina. La interacción más importante es en la acción diurética entre la cafeína y taurina la cual puede estar aumentada por ingesta de etanol.

Expertos en salud consideran a las bebidas energéticas no seguras. ¿Debemos preocuparnos? Las bebidas energizantes aportan ingestas de taurina tales, que cuando contiene la máxima concentración, corresponde a ingestas comprendidas entre 2,5 y 30 veces la máxima aportada por los alimentos (400 mg/día).

Respecto a la glucuronolactona los consumidores regulares (1 envase/día) de bebidas energizantes, ingieren tal cantidad (625 mg) que excede la ingesta normal (1,2 mg/día) en más de 500 veces. ¿Cuál es la razón de la adición de tales cantidades de taurina y glucuronolactona a las bebidas energizantes?

Según opinión de expertos internacionales es posible una interacción de los constituyentes de las bebidas energizantes, las cuales no han sido bien estudiadas.

### **EFFECTOS DE LOS XENOBIÓTICOS SOBRE LA SECRECIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE. ESTUDIOS REALIZADOS CON EL 2,4-D EN RATAS**

Stürtz N., Evangelista de Duffard A.M., Duffard R. Laboratorio de Toxicología Experimental (LATOEX). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 570. 2000 Rosario. Argentina.

Los xenobióticos pueden tener el efecto potencial de actuar sobre alguno de los procesos que intervienen en la producción, secreción y constitución de la leche -un sistema altamente regulado en el que intervienen hormonas, neurotransmisores y estímulos de la cría y de la madre- ejerciendo modificaciones que redundan en la calidad o cantidad de la leche producida. Para evaluar el efecto del herbicida ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) durante la lactancia, se trataron ratas madres en el día postparto 1, con distintas dosis del herbicida a través de diferentes vías de administración. No se observaron efectos tóxicos aparentes sobre las madres tratadas aunque sí, disminuciones en la ganancia de peso corporal de las crías (hasta el 50 % en algunos casos) y retardo en el día de apertura de los ojos. Se determinó una relación constante entre la concentración de 2,4-D en el suero de la madre / concentración de 2,4-D en la leche. 2,4-D también produjo disminución del contenido de lípidos totales, así como variación en el perfil de ácidos grasos poliinsaturados (fundamentalmente araquidónico y docosahexanoico) de la leche materna, alteraciones que podrían ser causales de los efectos adversos observados en las crías de madres expuestas al 2,4-D a través de la leche.

### **EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN CON METALES EN ALGAS Y MARISCOS DEL GOLFO SAN JORGE (ARGENTINA)**

Pérez, Adriana<sup>1</sup>; Farias Silvia S<sup>2</sup>.; Perez Laura<sup>1</sup>; Strobl Analia<sup>1</sup>; Adriana Piñero<sup>3</sup>; Clara Magdalena López<sup>3</sup>; Fajardo María Angélica<sup>1</sup>.

1-CRIDEICIT, Fac. Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia. Chubut. 2- Comisión Nacional de Energía Atómica, Unidad de Actividad Química, Centro Atómico Constituyente.- Av. Gral Paz 1499, 1650/San Martín. 3- Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. E-mail de contacto: aape-rez@sinectis.com.ar.

En la costa patagónica Argentina existe una gran variedad de moluscos bivalvos, que son recolectados como recurso alimentario y distintas especies de algas reconocidas por su valor nutritivo. El objetivo fue cuantificar los niveles de Pb, Cr y Cd en los *Aulacomya ater* (cholga) y *Mytilus edulis platensis* (mejillón) bivalvos y en *Porphyra columbina* (alga roja), determinar las concentraciones de macroelementos (Ca, Mg y P), microelementos (Fe, Zn, Cu, Cr, Mo, Mn y Se), elementos ultratraza (Ni, As, V, B y Co) y elementos no esenciales (Cd y Pb) a fin de establecer la máxima cantidad de bivalvos y algas que se podrían consumir y que no representen un riesgo para la salud en función de la Ingesta Semanal Provisionalmente Tolerable (ISTP).

Las muestras fueron digeridas por vía húmeda. Los analitos de interés se cuantificaron mediante un espectrómetro de plasma inductivo de argón axial, multielemental simultáneo, provisto de detector de estado sólido y automuestreador. Cd,

Pb, y Cr se cuantificaron por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.

Los sitios de muestreo fueron, Bahía Solano, Punta Maqueda, zonas alejadas de la actividad antropogénica y la desembocadura del Arroyo La Mata, la cual recibe efluentes de la actividad petrolera.

Las máximas concentraciones de elementos se han encontrado en la desembocadura del Arroyo La Mata, lugar considerado mas contaminado. Los valores de cadmio y plomo hallados no superan los 10 µg/g ps propuestos como límites máximos por SENASA. Sin embargo se han observado valores cercanos a la ISTP para el cadmio si se consumen los bivalvos o las algas.

Si se ingieren tres cucharadas de alga seca y molida, no se supera a la ISTP para el Cd y sí cubren la ingesta diaria recomendada de Vitamina C y un porcentaje importante de algunos de los elementos esenciales para una mujer joven adulta.

### **COLORANTES Y EDULCORANTES EN ALIMENTOS QUE CONSUME PREFERENTEMENTE LA POBLACIÓN INFANTIL**

Marcela Iljutko

Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Gral. San Martín. Avda. Gral. Paz entre Albarelos y Constituyentes (INTI) edificio 23. (1650) San Martín. Buenos Aires. Email: iljutko@arnet.com.ar

El uso de aditivos alimentarios se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido prin-

cipalmente a la necesidad de conservar los alimentos de producción industrial. Diferentes aditivos se usan para dar color o reforzar el color de algún ingrediente (colorantes), o como sustituyente del azúcar (edulcorantes). El objetivo del presente trabajo fue evaluar a través del rótulo, el contenido de colorantes (cualitativamente) y edulcorantes (cuali y cuantitativamente) en golosinas, jugos y polvos para preparar jugos, gelatinas, mermeladas y gaseosas, disponibles para la venta en mercados y supermercados de los partidos de Vicente López y San Martín en el período 2004/2005. Entre los colorantes más utilizados en mermeladas y gelatinas se encuentran algunos del grupo de los azoicos que se encuentran prohibidos en otros países (ejemplo: amaranto (123) en Estados Unidos). En el caso de los edulcorantes no nutritivos se utilizan ampliamente sacarina (954), ciclamato (952), aspartame (951) y acesulfame K (950). Las bebidas gaseosas, los jugos y los polvos para preparar jugos, contienen en su mayoría estos aditivos, independientemente de que se trate de productos rotulados como "light" o no.

Nuestros resultados sugieren que de esta manera la mayor parte de la población y en particular la población infantil, que consume preferentemente estos alimentos, se expone diariamente a estos aditivos alimentarios sin saberlo, y sin tener conocimiento alguno acerca de posibles efectos adversos que los mismos puedan causarles.

**VI CONGRESO LATINOAMERICANO DE MUTAGENESIS, CARCINOGENESIS Y  
TERATOGENESIS AMBIENTAL  
XIV CONGRESO ARGENTINO DE TOXICOLOGIA  
XXIV JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE TOXICOLOGIA**

**Ciudad de Mendoza, 1 al 4 de noviembre de 2005**

**Miércoles, 2 de noviembre / Wednesday, 2nd  
11:30 – 12:30**

**CONFERENCIA / LECTURE  
SALA / HALL: MAGNA**

*El siguiente resumen corresponde a la presentación que reemplazó a la de Rene Sotomayor /  
The following abstract corresponds to a presentation that was in place of that of Rene Sotomayor*

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN CÁNCER  
GÁSTRICO**

**Molecular epidemiology in gastric cancer**

Helena Groot de Restrepo y María Mercedes Torres.  
Laboratorio de Genética Humana. Universidad de los Andes

La genética toxicológica estudia los agentes químicos físicos o biológicos que interfieren con el ADN o con los procesos celulares normales, y los puede clasificar como agentes genotóxicos. La célula que ha sido agredida por estos agentes, puede seguir alguno de estos caminos: si hay reparación normal del daño en el ADN, la célula vuelve a su estado normal, si hay demasiado daño la célula muere, y si hay reparación defectuosa o insuficiente, aparecen las mutaciones. Estas mutaciones pueden originarse tanto en las células germinales como en las somáticas. Si ocurren en las células germinales, no afectan a la persona en donde aparece la mutación, pero ésta sí es transmitida a su descendencia y a generaciones futuras. En células somáticas, se afecta la persona en quien ocurre la mutación, no se transmite a su descendencia, y puede constituir uno de los pasos en la aparición de un cáncer. Los estudios sobre poblaciones humanas expuestas a sustancias genotóxicas deben hacerse bajo el concepto de epidemiología molecular, en donde además de evaluarse el aspecto epidemiológico tradicional, debe incluirse el uso de marcadores biológicos o biomarcadores que indiquen algunos pasos intermedios del proceso que lleva a la aparición de un cáncer antes de que ello ocurra.

El cáncer Gástrico (CG), una de las principales causas de mortalidad por cáncer en Colombia, es una enfermedad de etiología compleja, que involucra factores ambientales y de susceptibilidad genética como polimorfismos en enzimas encargadas de la desintoxicación de xenobióticos (Glutaciones, Citocromo p450), enzimas involucradas en la reparación de ADN (XRCC1), y facto-

res inmunogenéticos (IL1B y FNT). Su incidencia mundial es variable lo que puede ser atribuido a la distribución diferencial de estos polimorfismos en las poblaciones. En el presente estudio se evaluó la asociación de factores ambientales y genéticos con CG en dos poblaciones étnicamente diferentes, Bogotá (I) y Cauca (II). La delección homocigótica de las enzimas Glutacion S-transferasas M1 (GSTM1) y T1 (GSTT1) fueron determinadas por PCR y por RFLP-PCR las variantes genéticas de las enzimas CYP2E1 y XRCC1. En la población I se analizaron 111 donantes y 68 pacientes con CG, y en la población II, 96 donantes y 46 pacientes con CG. La asociación entre los polimorfismos y los factores ambientales fueron evaluadas mediante análisis de regresión logística. En la población I, se observó asociación entre las variantes del gen XRCC1 (Arg/Arg 194 ) y CG (OR:4.15; CI 95% [1.33 -12.9]), asimismo, el hábito de fumar y el consumo de comidas ahumadas estuvo asociado con CG (OR:3.96; CI 95% [1.61-2.81]) y OR:2.75; CI 95% [1.29- 5.87], respectivamente). En la población II, el polimorfismo de delección de la enzima GSTM1 fue asociado con CG (OR:5.45; CI 95% [1.72- 17.20]). Factores como fumar, consumo de alcohol e infección con H. pylori mostraron asociación (OR: 6.70; CI 95% [2.20-2.30]) (OR:3.27; CI 95% [1.14-9.4]) (OR:5.58; CI 95% 1.81-17.19]). La diversidad étnica en estas poblaciones podría ser la causa de la variación en las frecuencias génicas de estos marcadores de susceptibilidad a cáncer, y explicar parcialmente los resultados encontrados en estas dos poblaciones. Los resultados confirmaron al hábito de fumar como un importante factor de riesgo a cáncer gástrico.

**Viernes, 4 de noviembre / Friday, 4th  
09:00 – 11:00**

**MESA REDONDA 14 / SYMPOSIUM 14  
SALA / HALL: PLUMERILLO**

**INESTABILIDAD DE SISTEMAS GENÉTICOS  
NO MENDELIANOS EN TUMORES HUMANOS  
/ NO MENDELIAN GENETIC SYSTEMS INSTABILITY IN HUMAN TUMOURS**

Coordinador: NÉSTOR BIANCHI. Laboratorio de Genética Molecular Poblacional, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE). Argentina.

*El siguiente resumen corresponde a la presenta-*

*ción que reemplazó a la de Alberto Solari / The following abstract corresponds to a presentation that was in place of that of Alberto Solari*

### **ESTUDIO DE TASAS MUTACIONALES DE MICROSATÉLITES DE CROMOSOMA Y** **A study on mutation rates of Y chromosome microsatellites**

Catanesi, C.I.  
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)  
Laboratorio de Genética Molecular, C.C.403 (1900) La Plata,  
ccatanesi@imbice.org.ar

El cromosoma Y presenta dos regiones pseudo-autosómicas y una región específica masculina (MSY). La región MSY carece de homología con el cromosoma X y no sufre recombinación con él, por lo cual las mutaciones constituyen la única fuente de variación en dicha región. Los microsatélites localizados en la región MSY son utilizados en una amplia variedad de estudios y aplicaciones como genética forense, estudios de inestabilidad genética y estudios de filogenia. El modelo de mutación por pasos, aceptado como mecanismo de mutación de los microsatélites autosómicos, también se aplica a los de la región MSY. Según este modelo, los cambios ocurren por el agregado o sustracción de una unidad de repetición a un alelo original, siendo la probabilidad de ganancia mayor que la probabilidad de pérdida de una repetición, mientras que la ocurrencia de cambios de dos o más repeticiones es mucho menos frecuente. El estudio de las tasas de mutación de los microsatélites de la región MSY es de gran importancia para una correcta aplicación de estos marcadores en estudios genómicos y poblacionales. En un estudio colaborativo realizado por el Grupo Español Portugués de la International Society of Forensic Genetics (GEP-ISFG), se estimaron las tasas de mutación de 16 microsatélites de la región MSY (DYS19, DYS385, DYS389I y II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, DYS461, DYS635, GATA H4 y GATA A10) mediante el análisis de transferencias alélicas en pares padre-hijo. Se obtuvo una tasa de mutación de  $1,998 \times 10^{-3}$  para todos los loci (95% Int. de Confianza  $1.501 \times 10^{-3}$  -  $2.606 \times 10^{-3}$ ), mientras que las tasas específicas de locus variaron entre  $0,824 \times 10^{-3}$  (DYS438) y  $6,873 \times 10^{-3}$  (DYS439). La frecuencia de ganancia de repeticiones representó el doble que la frecuencia de pérdida. Además, se observó una tendencia a una mayor mutabilidad en los alelos con mayor número de repeticiones ( $>11$ ), y un aumento de la tasa de mutación con la edad paterna. Esta estrategia de análisis de la descendencia masculina ha demostrado ser de gran utilidad en la estimación de tasas de mutación específicas de microsatélites de MSY.

*El siguiente trabajo fue presentado en la Sesión de Pósters, sección Analítica, el día jueves 3 de*

*noviembre. El correspondiente resumen que se presenta a continuación, fue omitido por error en el Suplemento (Noviembre 2005) de Acta Toxicológica Argentina dedicado a este congreso.*

### **CUANTIFICACIÓN DE ARSENICO INORGÁNICO (III Y V) Y METABOLITOS METILADOS, ÁCIDOS MONOMETILARSÓNICO (MMA) Y DIMETILARSÍNICO (DMA), EN ORINA UTILIZANDO GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA INYECCIÓN EN FLUJO**

**Quantification of inorganic arsenic (III y V) and methylated metabolites; monomethylarsonic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in urine using flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry**

Navoni J.A., Olivera N.M.; Lenzken S.C.; Villamil Lepori E.C.; López C.M.  
Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires. Junin 956, (1113) Buenos Aires.  
E-mail: Jnavoni@ffybu.uba.ar

El arsénico (As) es un contaminante natural que afecta una amplia zona de nuestro país. En los últimos años, gracias a los estudios de especificación se ha logrado un gran avance en el conocimiento sobre la toxicidad de las especies arsenicales.

La concentración de (As) total urinario es un índice utilizado para evaluar exposición reciente a este tóxico.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar y validar un método rápido para valorar el contenido de arsénico total (Arsénico inorgánico: III y V) y sus metabolitos, los ácidos monometilarsónico (MMA) y dimetilarsínico (DMA)), responsables de la acción tóxica.

La metodología aplicada incluyó la derivatización de las especies arsenicales (As III, As V, MMA y DMA) utilizando una solución ácida de L-Cisteína al 4% y posterior valoración mediante un sistema de inyección manual REODYNE 7125 acoplado a un generador de hidruros VARIAN VGA77, con posterior cuantificación, utilizando un equipo de espectrometría de absorción atómica VARIAN AA-475 atomización por llama.

El coeficiente de variación intra e inter-ensayo fue de 11,00% y 14,15% respectivamente. El límite de detección obtenido fue de 1,81 µg/l y el de cuantificación de 6,03 µg/l

Si bien existen diversas metodologías para la cuantificación del arsénico total, el resultado obtenido requiere una adecuada interpretación debido a la posibilidad de sobreestimar el contenido por especies Arsenicales no tóxicas en las mismas.

La metodología propuesta es útil para evaluar la exposición al arsénico sin necesidad de utilizar prolongados pretratamientos, de forma más económica y rápida, evitando la sobreestimación por medición de especies del arsénico orgánicas no tóxicas.

Los siguientes resúmenes reemplazan a los que aparecen en *Acta Toxicológica Argentina volumen 13, Suplemento (Noviembre 2005), página 44, y que contienen errores de impresión.*

**EFFECTOS DEL PARAQUAT Y DEL PLOMO EN LA ACTIVIDAD DE COLINESTERASAS EN DOS ESPECIES DE INVERTEBRADOS ACUÁTICOS**  
**Effects of paraquat and lead on cholinesterase activity in two species of freshwater invertebrates**

Kristoff, G., Cochón, A., San Martín de Viale, L.C., Verrengia Guerrero, N. R.

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA. 4° piso, Pabellón II, Ciudad Universitaria, 1428. Tel/Fax: 4576 3342. E-mail: gkristoff@qb.fcen.uba.ar.

La inhibición de colinesterasas (ChE) ha sido utilizada por décadas para monitorear el grado de exposición a organofosforados y carbamatos. Sin embargo, en los últimos años, se ha reportado que otras sustancias también pueden producir una inhibición apreciable de ChE. El mecanismo de la inhibición involucraría al sitio aniónico de la enzima. En este grupo, se incluyen algunos metales: Cd(II), Cu(II), Hg(II), Pb(II); detergentes y el herbicida paraquat, entre otros. Dado que, en invertebrados no se ha estudiado el efecto del paraquat sobre la actividad de ChE, nuestro objetivo consistió en evaluar dicho efecto en dos invertebrados de agua dulce: *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus*, ambos recomendados para estudios de toxicidad de aguas. La actividad de ChE se midió según el método de Ellman utilizando yoduro de acetiltiocolina como sustrato. Los bioensayos realizados a un nivel de exposición de 2,5 mg de principio activo/L mostraron, en *B. glabrata*, un aumento en la inhibición de ChE con el tiempo de exposición, desde un 29% a las 24 hs hasta un 46% a las 96 hs con fitoquat (formulado comercial) y de un 16% a un 53% con paraquat droga pura. Luego de transferir los caracoles a un medio libre de herbicida por 48 hs, no se observó recuperación de la actividad enzimática. En *Lumbriculus variegatus*, en cambio, la inhibición enzimática resultó transitoria. Se observó un 10% de inhibición a las 24 hs que aumentó hasta el 30% a las 72 hs, pero a las 96 hs la actividad enzimática retornó a los valores controles. Al exponer por 48 hs a ambos invertebrados a 0,5 mg Pb(II)/L, se observó un 25% de inhibición en *B. glabrata* y un 20% en *L. variegatus*. Ante la exposición conjunta a plomo y paraquat se obtuvo un aumento en la inhibición enzimática llegando a un 50% en *B. glabrata* y a un 44% en *L. variegatus*. Estos resultados muestran que al igual que en vertebrados, paraquat y Pb(II) inhiben inespecíficamente a las colinesterasas de estos invertebrados. Considerando el efecto inhibitorio sobre ChE, los ejemplares de *B. glabrata* resultaron ser más susceptibles al paraquat que los oligoquetos.

**INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE COLINESTERASAS EN LUMBRICULUS VARIEGATUS Y BIOMPHALARIA GLABRATA POR METILAZINFOS**

**Inhibition of cholinesterase activity by azinphos methyl in Lumbriculus variegatus and Biomphalaria glabrata**

Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N., Pechén de D'Angelo, A., Cochón, A.

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA. 4° piso, Pabellón II, Ciudad Universitaria, 1428. Tel/Fax: 4576 3342. E-mail: gkristoff@qb.fcen.uba.ar

El metilazinfos es un insecticida organofosforado que actúa como un inhibidor de las colinesterasas (ChE). El presente trabajo tiene como objetivo comparar el efecto del metilazinfos en la actividad de ChE en dos especies de invertebrados acuáticos:

*Lumbriculus variegatus* y *Biomphalaria glabrata*. La actividad de ChE se midió según el método de Ellman utilizando yoduro de acetiltiocolina como sustrato. Al exponer por 48 hs a *L. variegatus* a distintas concentraciones de metilazinfos, se obtuvo una dosis de no efecto de 0,001 mg/L y una concentración inhibitoria 50 (CI50) de 0,006 mg/L. A dosis mayores a 0,05 mg/L la inhibición resultó del 90% llegando a un 99% de inhibición con 0,25 mg/L. La inhibición enzimática, dependiente de la dosis, se vio acompañada por un aumento de rigidez y de inmovilidad. Sin embargo, no se observó mortalidad. Al exponer a *B. glabrata* por 48 hs a distintas concentraciones de metilazinfos se obtuvo una dosis de no efecto de 0,5 mg/L y una CI 50 de 5,86 mg/L. Con una concentración de 15 mg/L se observó una inhibición de ChE del 66%. Al evaluar cómo afectaba el tiempo de exposición en la inhibición enzimática, se observó en ambos invertebrados una disminución de la actividad a las 24 hs, haciéndose máxima a las 48 hs y permaneciendo constante durante el tiempo ensayado (7 días). Los bioensayos de recuperación, luego de exponer por 48 hs al insecticida, mostraron en *L. variegatus* una recuperación de la actividad de ChE a los 21 días si la concentración utilizada era la CI50, en cambio, si la concentración utilizada era 0,1 mg/L sólo se recuperó un 10% de la actividad. En *B. glabrata* luego de estar expuesto por 48 hs a la CI50 se observó un 25% de recuperación a los 21 días. Los resultados obtenidos muestran que ejemplares de *L. variegatus* son más susceptibles a la inhibición de ChE por metilazinfos que los del gastrópodo. La CI50 es 1000 veces menor y la dosis de no efecto 500 veces menor en *L. variegatus* que en *B. glabrata*. La actividad de ChE de *L. variegatus* podría ser utilizada como biomarcador de exposición a metilazinfos, en aguas contaminadas aún a dosis muy bajas del insecticida.

*El siguiente resumen reemplaza al que aparece en Acta Toxicológica Arg. vol. 13, Supl. (Nov. 2005), página 48, y que contiene errores de impresión.*

## **NIVELES DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBS) EN PLASMA EN LA POBLACIÓN GENERAL DEL ÁREA METROPOLITANA DE BUENOS AIRES**

### ***Polychlorinated biphenyls (PCBs) levels in blood plasma in general people from Buenos Aires area***

Ridolfi A.; Villaamil Lepori E.C. ; Rodríguez Girault M. E. Álvarez G. ; Mirson, D.; Bardoni, Natalia; López, C.M.; \*Sosa; G. Cátedra de Toxicología-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA-Junín 956 (113) Buenos Aires-Te/Fax: 54-11-4964-8283/8284. Email: evillaam@ffyba.uba.ar

\* Dirección de Salud y Asistencia Social- UBA

Los PCBs son un grupo de congéneres muy estables, poco biodegradables los cuales se acumulan en la cadena alimentaria y responsables de contaminaciones y los consecuentes efectos sobre la salud humana por su utilización en múltiples industrias.

Los niveles de PCBs en plasma o suero humano han sido propuestos como indicadores de exposición tanto en el control de personas expuestas en el ámbito laboral como a fin de estimar la contaminación ambiental en la población general.

Es escasa la información en nuestro país sobre los niveles de PCBs en medios biológicos humanos. En este trabajo se presentan las concentraciones halladas en muestras de plasma de 55 individuos de ambos sexos con edades comprendidas entre 18 y 56 años.

Se empleó para el análisis de PCBs la técnica de Janak, K y col. (1999) modificada, mediante extracción en fase sólida con descomposición de lípidos on-column. Para la investigación y cuantificación se empleó un GC/ECD, utilizando dos columnas (HP-PAS 5 y HP-PAS 1701), como estándar interno decaclorobifenilo y como testigos una mezcla de los congéneres 28, 52, 101, 138, 153 y 180.

El valor medio de la sumas de congéneres investigados en la población estudiada fue  $1,4 \pm 1,2$  ppb (ng/ml), con un rango de concentraciones comprendido entre no detectable (ND) y 6,0 ppb.

El 98% de las muestras contenían al menos uno de los congéneres analizados. Los congéneres que aparecieron con mayor frecuencia fueron el 28 y el 52 (87,3% respectivamente), siguiéndole el 180 (24%), 153 (20%), y el 138 y 101 (7,3% cada uno). El mayor rango de concentraciones de los congéneres individuales fue el congéner 28 el cual estuvo comprendido entre ND a 5,0 ppb. Le sigue en importancia el 52 con un valor máximo de 2,6 ppb

El nivel medio de la sumas de congéneres de PCBs hallado en este estudio se considera dentro de los reportados para la población general en la bibliografía consultada.

*El siguiente resumen reemplaza al que aparece en Acta Toxicológica Argentina volumen 13, Suplemento (Noviembre 2005), página 62, y que contiene errores de impresión.*

## **ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA POBLACIÓN GENERAL Y LABORAL DE SEIS CONGÉNERES DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBS) EN PLASMA HUMANO**

### ***Comparative study between general and working people of six polychlorinated biphenyls (PCBs) congeners in human plasma***

Villaamil Lepori E.C. ; Ridolfi A.; Rodríguez Girault M. E.; Álvarez G. ; Mirson, D. El Kassisse, Y.

Cátedra de Toxicología-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA-Junín 956 (113) Buenos Aires-Te/Fax: 54-11-4964-8283/8284. Email: evillaam@ffyba.uba.ar

Los PCBs son un grupo de mas de 200 congéneres muy estables, liposolubles y poco biodegradables los cuales se acumulan en la cadena alimentaria.

Los niveles de PCBs en plasma o suero humano han sido propuestos como indicadores de exposición tanto en el control de personas expuestas en el ámbito laboral como a fin de estimar la contaminación ambiental en la población general.

Es difícil la interpretación de los resultados de los niveles de los diferentes congéneres de PCBs en plasma a fin de estimar un mayor o menor riesgo de intoxicación. Con el objeto de implementar una herramienta que ayude a la interpretación de los resultados analíticos es que se presenta este trabajo.

Se comparan los resultados obtenidos del estudio de dos poblaciones: población general y población laboral. En ambas poblaciones de empleo para el análisis de los congéneres de PCBs la técnica de Janak, K y col. (1999) modificada, mediante extracción en fase sólida con descomposición de lípidos on-column. Para la investigación y cuantificación se empleó un GC/ECD, utilizando dos columnas (HP-PAS 5 y HP-PAS 1701), como estándar interno decaclorobifenilo y como testigos una mezcla de los congéneres 28, 52, 101, 138, 153 y 180.

Aún cuando en ambas poblaciones la suma de congéneres presenta casi iguales frecuencias, 98% de las muestras de la población no expuesta y 96% de la expuesta, los congéneres individuales presentan diferencias importantes. En la población general los mas frecuente son los congéneres 28 y 52, mientras que en la expuesta cobran importancia los congéneres más pesados 138, 153 y 180 (50, 43 y 56% respectivamente)

Si comparamos las concentraciones medias de ambas poblaciones encontramos diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) en el caso de los congéneres 52, 101, 138, 153 y 180 y no en el congéner 28, siendo notablemente superiores los niveles medios en el caso de la población laboral.

Comparando ambos parámetros, frecuencia y valores medios sería posible diferenciar si la población estudiada pertenece a una u otra categoría. Proyecto UBACyT 075