

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 15
N° 1
Julio 2007

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

Suplente

Daniel González

Comité Científico

Marta A. Carballo
José A. Castro
Osvaldo 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

Ofelia C. Acosta de Pérez *Fac. Ciencias Vet.-UNNE, CONICET*
Valentina Olmos *FFyB - UBA*
Noemí R. Verrengia Guerrero *FCEyN - 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)

SEGURIDAD EN LA APLICACIÓN DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS Y FRUTÍCOLAS SAFETY IN THE APPLICATION OF PHITOSANITARY PRODUCTS IN HORTICULTURAL AND FRUIT CROPS <i>Bulacio, Liliana G.; Giuliani, Susana L.; Panelo, Marta S.; Giolito, Irma</i>	1
OCCURRENCE OF MICROCYSTIS AERUGINOSA AND MICROCYSTINS IN RIO DE LA PLATA RIVER (ARGENTINA) <i>Andrinolo, Darío; Pereira, Paulo; Giannuzzi, Leda; Aura, Claudia; Massera, Silvia; Caneo, Mariela; Caixach, Josep; Barco, Mónica and Echenique, Ricardo</i>	8
HUMORAL IMMUNE ALTERATIONS CAUSED BY LEAD: STUDIES ON AN ADULT TOAD MODEL ALTERACIONES INMUNES HUMORALES CAUSADAS POR PLOMO: ESTUDIOS EN UN MODELO DE SAPO ADULTO <i>Rosenberg, Carolina E.; Fink, Nilda E.; Salibián Alfredo</i>	16
RESUMENES DE COMUNICACIONES LIBRES DEL SEMINARIO - TALLER SOBRE SITIOS CONTAMINADOS CON PLOMO Y SALUD HUMANA y JORNADAS NACIONALES DE EVALUACIÓN DE IMPACTO DE SITIOS CONTAMINADOS SOBRE SALUD Y AMBIENTE	24
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES	29

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

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

SEGURIDAD EN LA APLICACIÓN DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS Y FRUTÍCOLAS

Bulacio, Liliana G.¹ (*); Giuliani, Susana L.¹; Panelo, Marta S.¹; Giolito, Irma ²

¹Facultad de Ciencias Agrarias UNR –CC 14 (S2125ZAA) Zavalla. Tel: 0341-4970080 Fax: 0341-4970085

² IDEB. (Instituto de Estudios Bioquímicos) Mendoza 1180.Rosario. Tel: 0341-424999

(* autor a quién dirigir la correspondencia: e-mail: lgb@tower.com.ar

Resumen: SEGURIDAD EN LA APLICACIÓN DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS Y FRUTÍCOLAS. Liliana G. Bulacio; Susana L. Giuliani; Marta S. Panelo; Irma Giolito. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (1): 1-7*. En sistemas de producción intensivos, el uso incorrecto de productos fitosanitarios puede afectar la salud de los operarios. El objetivo del trabajo fue determinar sobre el cuerpo del operario aplicador las zonas de deposición de agroquímico al momento de realizar tratamientos foliares en cultivos hortícolas de diferente porte y en monte frutal. Se trabajó en lotes de acelga (*Beta vulgaris var cicla* L.), de alcaucil (*Cynara scolymus* L.), de poroto chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.) y en monte de naranjos (*Citrus sp.*). En cada lote se simuló 4 aplicaciones foliares de fitosanitarios utilizando mochila manual, reemplazando los productos por una solución de fenoftaleína (0,5 g/l). En cada aplicación se recorrieron 100 m entre las hileras de cultivo y previo a cada una de ellas se distribuyeron sobre distintas zonas del cuerpo del operario parches de tela de algodón blanca de 10 cm x 10 cm. En laboratorio se recuperó el residuo de fenoftaleína de cada parche con hidróxido de sodio 0,1 N y se valoró en espectrofotómetro a 540 nm. Los residuos detectados en la parte anterior y posterior del cuerpo del aplicador, respectivamente, fueron: en acelga 1095,6 µg/cm² y 91,02 µg/cm², en alcaucil 787,00 µg/cm² y 404,00 µg/cm², en poroto chaucha 197,50 µg/cm² y 68,35 µg/cm², en monte frutal 481,70 µg/cm² y 44,20 µg/cm². Se demostró la exposición de todo el cuerpo del operario al realizar tratamientos en condiciones similares a las de estos ensayos, validando la necesidad de contar con elementos de protección que lo cubran en forma total.

Palabras clave: *Beta vulgaris* var. *cicla*; *Cynara scolymus* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; *Citrus sp.*; Agroquímicos; Riesgo; Contaminación; Seguridad

Abstract: SAFETY IN THE APPLICATION OF PHITOSANITARY PRODUCTS IN HORTICULTURAL AND FRUIT CROPS. Liliana G. Bulacio; Susana L. Giuliani; Marta S. Panelo; Irma Giolito. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (1): 1-7*. In intensive production systems, the improper use of phytosanitary products may affect the operator's health. The objective of this work was to determine the areas the agrochemical deposits on the worker's body, at the time of applying foliar treatments in horticultural crops of several heights and in fruit trees. It was performed in lots of Swiss chard (*Beta vulgaris var cicla* L.), artichoke (*Cynara scolymus* L.), string bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in orange (*Citrus sp.*) groves. In each lot, 4 foliar applications of phytosanitary products were simulated using a backpack sprinker and replacing the products for a phenolphthaleine solution (0.5 g/l). In each application, 100 m among the crop lines were covered and before each of them, 10x 10 cm white cotton cloth patches were laid on different areas of the worker's body. At the laboratory, the residue of phenolphthaleine was recovered from each patch by means of 0.1 N sodium hydroxide and it was then valued in a spectrophotometer at 540 nm. Residues detected in the front and the back of the worker's body were, respectively, in Swiss chard 1095,6 µg/cm² and 91,02 µg/cm², in artichoke 787,00 µg/cm² and 404,00 µg/cm², in string bean 197,50 µg/cm² and 68,35 µg/cm², in orange trees 481,70 µg/cm² and 44,20 µg/cm². The exposition of the whole body of the worker was demonstrated by performing treatments in conditions similar to those of these trials, validating the need of having protection elements that completely cover it.

Key words: *Beta vulgaris* var. *cicla*; *Cynara scolymus* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; *Citrus sp.*; Agrochemicals; Risk; Contamination; Safety

Palavras-chave: *Beta vulgaris* var. *cicla*; *Cynara scolymus* L.; *Phaseolus vulgaris* L.; *Citrus sp.*; Defensivos agrícolas; Risco; Contaminação; Segurança.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial obliga al continuo estudio y adopción de nuevos métodos y técnicas de producción para incrementar la calidad y cantidad de los mismos, como biotecnología, manejo integrado de plagas entre otros. Aún así, los productos fitosanitarios seguirán desempeñando un rol importante en la protección de los cultivos en las próximas décadas (1,2). Sin embargo, es necesario conocer y trabajar en los distintos aspectos que hacen al manejo racional de agroquímicos para evitar efectos directos e indirectos sobre el hombre y el ambiente (3).

Son diversos los inconvenientes producidos por el mal uso de fitosanitarios en cultivos hortícolas y frutícolas: elección de productos no adecua-

dos, subdosis o sobredosis, presencia de residuos en productos frescos, descarte inadecuado de envases, falta de mantenimiento y manejo inadecuado de los equipos de aplicación, contaminación personal del aplicador, entre otros. En este último caso, a los riesgos propios de la actividad laboral, debemos agregar el riesgo de tipo químico derivado del uso de fitosanitarios (4).

Los elementos de protección personal disponibles en el mercado presentan el inconveniente de no estar normalizados, no adecuándose a las condiciones reales de trabajo, por lo cual en la práctica se descarta su uso. Sobre el tipo de protección a usar influyen no sólo las condiciones ambientales, los materiales de confección de los equipos protectores y las características personales del aplicador, sino también distintos

aspectos del cultivo a tratar: altura, densidad de plantación, producción al aire libre o bajo protección, equipos de aplicación utilizados, entre otros.

En todo lugar y momento en que se usan agroquímicos es necesario asegurar de que los operarios encargados de la preparación y aplicación, sean capaces de protegerse lo suficiente para su seguridad personal (5).

En los sistemas hortícolas y frutícolas con uso continuo y a gran escala de productos fitosanitarios aplicados vía foliar, la contaminación del personal es un punto crítico.

En este tema, en Argentina, se reconocen los aportes de los trabajos realizados en cultivos frutales en el Alto Valle de Río Negro (6), y los desarrollados en Rosario (7). También son importantes los estudios en Brasil (8) en zonas hortícolas y con diferentes equipos de aplicación. Aún cuando los resultados son variables y fueron obtenidos sobre un número reducido de especies, indican en general la necesidad de trabajar con equipos de protección personal en todas las situaciones. Sin embargo, en los sistemas intensivos hortícolas y frutícolas, tanto a nivel productor como a nivel técnico, se sigue discutiendo la necesidad e importancia de los elementos de seguridad personal para su uso en cultivos diferentes a los incluidos en los estudios, relativizando el tema de la contaminación del personal en la mayoría de las actividades.

Acorde con los trabajos del grupo en la línea de Seguridad Personal, el objetivo fue determinar sobre el cuerpo del operario aplicador las zonas de deposición de producto al momento de realizar un tratamiento foliar con fitosanitarios en cultivos hortícolas de diferentes alturas, acelga (bajo porte), alcaucil (mediano porte), poroto (alto porte) y en un monte frutal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos con especies hortícolas se realizaron en un campo de un productor de la zona de Rosario, Provincia Santa Fe, Argentina, en condiciones de humedad relativa ambiente del 60 %, con velocidad promedio del viento de 5 km/h y temperatura promedio del aire de 20 °C.

Se trabajó sobre cultivos de:

1. acelga (*Beta vulgaris var cicla* L.), especie de bajo porte, (promedio 0,60 m de altura), marco de plantación 0,70 m entre hileras por 0,30 m entre plantas, a doble hilera/lomo.
2. alcaucil (*Cynara scolymus* L.) cv Oro Verde, especie de mediano porte (promedio 1m de altura), marco de plantación de 1,40 m entre hileras por 0,70 m entre plantas.
3. poroto chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.), especie de alto porte (promedio 2,10 m de altura), marco de plantación 1,40 m entre hileras por 0,70 m entre plantas, líneas apareadas y tutoradas con cañas sistema carpa.
4. El ensayo en monte frutal se realizó en un

campo de un productor de la zona de Firmat, provincia de Santa Fe, Argentina, en condiciones de humedad relativa del 60%, con velocidad promedio del viento de 6 km/h y temperatura promedio del aire de 19°C. Se trabajó sobre un lote de naranjos, con plantas de 2,60 m de altura promedio distribuidas en tresbolillo, manteniendo 5 m entre plantas.

En todos los lotes de cultivos se simularon 4 aplicaciones foliares, reemplazando el producto fitosanitario por una solución de colorante fenoftaleína (0,5 g/l) con mochila manual de 20 l de capacidad, con un solo pico y con pastilla tipo abanico plano 8002.

El cuerpo del aplicador (diestro) fue cubierto con un traje protector, sobre el cual se dispusieron en distintos puntos de la parte anterior y posterior y previo a cada aplicación de colorante, parches de tela de algodón de 10 cm x 10 cm.

Luego de cada tratamiento cada parche fue identificado y colocado en bolsa de polietileno cristal de 50 µm, y guardado en recipiente protector de isopor para su traslado a laboratorio.

En el laboratorio del Instituto de Estudios Bioquímicos (IDEB) de Rosario se cortó cada parche en 10 porciones más pequeñas, que cubrieron una superficie total mínima para el análisis de 10 cm². Los trozos se colocaron en vasos de precipitado de 50 cc de capacidad, donde se agregaron 20 ml de una solución de hidróxido de sodio 0,1 N, dejándose en maceración y mezcla por rotación durante 1h. Posteriormente, se transfirieron los macerados a tubos de ensayo y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. El sobrenadante obtenido fue leído en espectrofotómetro a 540 nm. Se compararon las densidades ópticas con una curva de calibración con solución de fenoftaleína en un rango de concentración de 0,01 a 0,25 g/l. Los resultados se expresaron en µg/cm².

El análisis de los datos, para cada situación de cultivo, considerando la parte anterior y posterior del cuerpo del operario por separado, se efectuó según un diseño estadístico completamente aleatorizado (9), con 4 repeticiones.

A cada parche ubicado sobre el cuerpo del operario se le asignó un número al azar y se compararon por un lado todas las zonas marcadas en la parte anterior y por otro lado las zonas marcadas en la parte posterior del cuerpo del operario.

Cada una de las 4 aplicaciones foliares efectuadas en cada lote de cultivo se consideró 1 repetición.

Efectuado el ANOVA, la comparación de medias se realizó por el Test de Duncan al nivel del 5 % de probabilidades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de las aplicaciones de colorante en acelga, los resultados mostraron que todos los puntos evaluados (Tabla 1) en la parte anterior recibieron colorante durante la aplicación concen-

trándose los valores de residuos más altos en pies (408 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 37,24%), piernas (204,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 18,70%) y muslos (204,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 18,65%). En la parte posterior los valores más altos corresponden a las piernas (27,82 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 30,57%).

Es de destacar la cantidad de fenofaleína detectada en la mano derecha (40,20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 3,67%) con la cual se manejó la lanza de la mochila, y en el antebrazo posterior izquierdo (24,80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 27,25%), que al rotarlo para manipular la palanca que da presión al sistema, quedó más expuesto a recibir colorante.

En los tratamientos en alcaucil, también todos los puntos evaluados en la parte anterior del

cuerpo del operario recibieron colorante durante la aplicación (Tabla 2) distribuyéndose en cabeza (51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 6,48%), en tronco/abdomen (101 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 12,83%), en extremidades superiores (175 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 22,24%) y en extremidades inferiores (460 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 58,45%).

En la parte posterior no se detectó colorante en la parte inferior del abdomen área de apoyo de la mochila, siendo la distribución en cabeza (24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 5,94%), en tronco/abdomen (55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 13,61%), en extremidades superiores (76 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 18,81%) y en las inferiores (249 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 61,63%).

Del conjunto se destacan los valores de colorante recuperado de los parches ubicados en los

Tabla 1. Valores promedios totales ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y porcentajes (%) de residuos de fenofaleína detectados en las distintas áreas del cuerpo del aplicador, parte anterior y posterior luego de la simulación de un tratamiento foliar en cultivo de acelga. Rosario, FCAUNR.

Zona del cuerpo	Parte anterior del cuerpo		Parte posterior del cuerpo	
	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	%	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	%
Cabeza: frente nuca	2.00	l	0.18	
Cabeza: mejilla derecha	2.20	l	0.20	
Cabeza: mejilla izquierda	5.00	l	0.46	
Boca	10.20	k	0.93	
Cuello	5.00	l	0.46	
Brazo derecho	5.60	l	3.40	g
Antebrazo derecho	11.80	jk	6.20	de
Tronco: lado derecho superior	12.00	ijk	2.80	gh
Tronco: lado izquierdo superior	13.60	hijk	4.00	fg
Tronco: lado derecho inferior	14.60	hi	1.00	i
Tronco: lado izquierdo inferior	17.00	h	1.60	hi
Brazo izquierdo	28.00	g	7.40	d
Antebrazo izquierdo	16.80	h	24.80	a
Abdomen gluteo derecho	32.20	f	7.00	d
Abdomen gluteo izquierdo	37.40	e	5.00	ef
Muslo derecho	107.40	b		
Muslo izquierdo	97.00	d		
Pierna derecha	95.40	d	12.22	c
Pierna izquierda	109.40	b	15.60	b
Mano: cara dorzal derecha	40.20	e		
Mano: cara dorzal izquierda	24.80	h		
Pie: cara dorsal talón derecho	306.00	a		
Pie: cara dorsal talón izquierdo	102.00	c		

Para cada columna de residuos de colorante, considerando por separado la parte anterior y posterior del cuerpo del operario, valores promedios seguidos de igual letra minúscula no difieren según el Test de Duncan ($p < 0,05$).

pies, que en este estudio y por la forma de aplicación "circular" del producto sobre la planta para poder tratar todas las hojas, estuvieron más expuestos y recibieron por tanto mayor deposición de fenoftaleína.

Los resultados de las aplicaciones en cultivo de poroto chaucha mostraron que en el cuerpo del aplicador, la totalidad de los puntos frontales recibieron colorante (Tabla 3); en la parte posterior, la zona baja del tronco, los glúteos y los muslos, puntos de apoyo de la mochila, no recibieron marcador. Considerando todo el cuerpo, el residuo en cabeza fue de (56,95 µg/cm²; 21,42%), en tronco/abdomen (37,85 µg/cm²; 14,24%), en extremidades superiores (104,60

µg/cm²; 39,35%) y en inferiores (66,45 µg/cm²; 25,00%). Destacamos el residuo en la frente, en las manos, especialmente la derecha con la cual se manejó la lanza de la mochila, y en los pies.

Si se comparan las aplicaciones en todos los cultivos hortícolas, la parte delantera del cuerpo fue la que recibió mayor cantidad de producto debido a que los tratamientos se realizaron con mochila manual y con movimientos de la lanza hacia delante. Cuando se trataron cultivos de bajo (acelga) y mediano porte (alcaucil) la mayor deposición fue en los pies del operario porque las aplicaciones se efectuaron con la lanza hacia abajo.

En los tratamientos en cultivos de alto porte

Tabla 2. Valores promedios totales (µg/cm²) y porcentajes (%) de residuos de fenoftaleína detectados en las distintas áreas del cuerpo del aplicador, parte anterior y posterior luego de la simulación de un tratamiento foliar en cultivo de alcaucil. Zavalla, FCAUNR.

Zona del cuerpo	Parte anterior del cuerpo		Parte posterior del cuerpo	
	µg / cm ²	%	µg / cm ²	%
Cabeza: frente nuca	15.00 efg	1.91	10.00 c	2.47
Cabeza: mejilla derecha	7.00 fg	0.89		
Cabeza: mejilla izquierda	9.00 efg	1.14		
Boca	10.00 efg	1.27		
Cuello	10.00 efg	1.27	14.00 c	3.47
Brazo derecho	38.00 cd	4.83	52.00 b	12.87
Antebrazo derecho	53.00 c	6.73		0.00
Tronco: lado derecho superior	25.00 def	3.18	23.00 c	5.69
Tronco: lado izquierdo superior	10.00 efg	1.27	25.00 c	6.19
Tronco: lado derecho inferior	4.00 g	0.51	3.00 c	0.74
Tronco: lado izquierdo inferior	10.00 efg	1.27	4.00 c	0.99
Brazo izquierdo	30.00 de	3.81	14.00 c	3.47
Antebrazo izquierdo	10.00 efg	1.27	10.00 c	2.48
Abdomen gluteo derecho	29.00 de	3.68		0.00
Abdomen gluteo izquierdo	23.00 defg	2.92		0.00
Muslo derecho	10.00 efg	1.27	10.00 c	2.48
Muslo izquierdo	14.00 efg	1.78	24.00 c	5.94
Pierna derecha	12.00 efg	1.52	10.00 c	2.48
Pierna izquierda	36.00 cd	4.57	4.00 c	0.99
Mano: cara dorsal derecha	20.00 defg	2.54		0.00
Mano: cara dorsal izquierda	24.00 defg	3.05		0.00
Pie: cara dorsal talón derecho	238.00 a	30.24	140.00 a	34.65
Pie: cara dorsal talón izquierdo	150.00 b	19.06	61.00 b	15.10

Para cada columna de residuos de colorante, considerando por separado la parte anterior y posterior del cuerpo del operario, valores promedios seguidos de igual letra minúscula no difieren según el Test de Duncan (p < 0,05).

Tabla 3. Valores promedios totales ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y porcentajes (%) de residuos de fenofaleína detectados en las distintas áreas del cuerpo del aplicador, parte anterior y posterior luego de la simulación de un tratamiento foliar en cultivo de poroto chaucha. Rosario, FCAUNR.

Zona del cuerpo	Parte anterior del cuerpo		Parte posterior del cuerpo	
	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	%	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	%
Cabeza: frente nuca	23.05 a	11.67	3.30 de	4.83
Cabeza: mejilla derecha	8.80 ef	4.46		
Cabeza: mejilla izquierda	3.90 jk	1.97		
Boca	5.40 hij	2.73		
Cuello	3.90 jk	1.97	8.60 a	12.58
Brazo derecho	8.15 efgh	4.13	9.35 a	13.68
Antebrazo derecho	12.25 d	6.20	6.95 b	10.17
Tronco: lado derecho superior	5.30 ij	2.68	5.55 bc	8.12
Tronco: lado izquierdo superior	1.60 kl	0.81	5.85 b	8.56
Tronco: lado derecho inferior	8.20 efgh	4.15	0.00	0.00
Tronco: lado izquierdo inferior	2.30 jk	1.16	0.00	0.00
Brazo izquierdo	8.45 efg	4.28	8.30 a	12.14
Antebrazo izquierdo	10.50 de	5.32	8.00 a	11.70
Abdomen gluteo derecho	7.95 efghi	4.03	0.00	0.00
Abdomen gluteo izquierdo	1.10 l	0.56	0.00	0.00
Muslo derecho	5.80 ghij	2.94	0.00	0.00
Muslo izquierdo	6.15 fghij	3.11	0.00	0.00
Pierna derecha	6.10 fghij	3.09	4.00 cd	5.85
Pierna izquierda	6.90 fghij	3.49	1.70 ef	2.49
Mano: cara dorzal derecha	19.70 b	9.97		
Mano: cara dorzal izquierda	12.95 d	6.56		
Pie: cara dorsal talón derecho	13.25 d	6.71	3.45 d	5.05
Pie: cara dorsal talón izquierdo	15.80 c	8.00	3.30 d	4.83

Para cada columna de residuos de colorante, considerando por separado la parte anterior y posterior del cuerpo del operario, valores promedios seguidos de igual letra minúscula no difieren según el Test de Duncan ($p < 0,05$).

(poroto chaucha) se localizó mayor cantidad de producto en cabeza y en extremidades superiores e inferiores porque la forma de aplicación fue con movimientos amplios de la lanza de arriba hacia abajo.

En las aplicaciones en monte frutal, los datos indicaron que todas las zonas testeadas sobre el cuerpo del operario recibieron producto (colorante) durante las aplicaciones (Tabla 4), con mayor deposición en la parte anterior del cuerpo en relación a la posterior (11:1).

En la parte delantera fue importante la presencia de residuos en manos (derecha $47,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 9,88%); izquierda ($33,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 6,95%), en cabeza ($96,90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 20,12%), parte superior del abdomen ($44,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 9,29%), y parte

superior de miembros inferiores ($83,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 17,25%).

En la parte posterior del cuerpo la menor deposición de fenofaleína tuvo una distribución más irregular, destacándose el valor en antebrazo derecho ($6,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 13,91%) que junto con el valor en mano derecha se corresponden con el manejo de la lanza aplicadora de la mochila. También la parte posterior de la cabeza ($4,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 9,16%) y parte superior de la espalda ($5,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 12,67%), recibieron cantidades importantes de fenofaleína.

En monte frutal debido a que las aplicaciones se realizaron con la lanza dirigida hacia arriba por la altura de las plantas, no hubo diferencias significativas entre las distintas partes del cuerpo.

Tabla 4. Valores promedios totales ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y porcentajes (%) de residuos de fenofaltaína detectados en las distintas áreas del cuerpo del aplicador, parte anterior y posterior luego de la simulación de un tratamiento foliar en cultivo de cítrico. Rosario, FCAUNR.

Zona del cuerpo	Parte anterior del cuerpo		Parte posterior del cuerpo	
	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	%	$\mu\text{g} / \text{cm}^2$	%
Cabeza: parte superior	14.50 bc	3.01		
Cabeza: frente nuca	24.65 bc	5.12	1.15 fgh	2.60
Cabeza: mejilla derecha	18.60 bc	3.86		
Cabeza: mejilla izquierda	10.55 c	2.19		
Boca cuello	28.60 bc	5.94	2.90 bcd	6.56
Brazo derecho	19.30 bc	4.01	3.95 bc	8.94
Antebrazo derecho	14.75 bc	3.06	6.15 a	13.91
Tronco: lado derecho superior	28.45 bc	5.91	2.60 cdef	5.88
Tronco: lado izquierdo superior	21.10 bc	4.38	3.0 cde	6.79
Tronco: lado derecho inferior	11.95 c	2.48	0.50 h	1.13
Tronco: lado izquierdo inferior	14.55 bc	3.02	1.00 gh	2.26
Brazo izquierdo	15.30 bc	3.18	3.80 bc	8.60
Antebrazo izquierdo	18.35 bc	3.81	2.30 defg	5.20
Abdomen gluteo derecho	22.50 bc	4.65	0.50 h	1.13
Abdomen gluteo izquierdo	22.25 bc	4.62	0.75 gh	1.70
Muslo derecho	23.40 bc	4.86	4.95 ab	11.20
Muslo izquierdo	27.05 bc	5.62	0.60 h	1.36
Pierna derecha	15.50 bc	3.22	3.20 cde	7.24
Pierna izquierda	17.10 bc	3.55	2.80 cde	6.33
Mano: cara dorzal derecha	47.60 a	9.88		
Mano: cara dorzal izquierda	33.50 ab	6.95		
Pie: cara dorsal talón derecho	19.90 bc	4.13	1.75 efgh	3.96
Pie: cara dorsal talón izquierdo	12.25 c	2.54	2.30 defg	5.20

Para cada columna de residuos de colorante, considerando por separado la parte anterior y posterior del cuerpo del operario, valores promedios seguidos de igual letra minúscula no difieren según el Test de Duncan ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

Aún trabajando en cultivos de distintas especies, con variaciones en su altura y en su marco de plantación, los resultados mostraron claramente la exposición de todo el cuerpo del operario al momento de realizar una aplicación similar a la de los ensayos. Si bien existieron variaciones en la distribución de los residuos en las distintas partes del cuerpo, los datos validan la necesidad de contar con elementos de protección que lo cubran en forma total.

Experimentos similares y complementarios del presente, deben realizarse en condiciones diferentes de cultivo a los fines de ampliar la información disponible que permita evaluar adecuadamente los riesgos de exposición de los operarios y proponer medidas adecuadas para la seguridad personal.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Bulacio, L.G.; Saín, O.L.; Martínez, S. (2007). Fitosanitarios. Riesgos y Toxicidad. 2da. Ed. Rosario: UNR Editora.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (1990). Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Roma- Italia.
3. Machado Neto, J.G. (1991). Ecotoxicología de agrotóxicos. Jaboticabal: Facultad Ciencias Agrarias y Veterinarias-Universidad Nacional Estado de San Pablo (FCAV-UNESP).
4. Panelo, M.S.; Bulacio, L.G. (2000). Cinturón hortícola de Rosario: situación actual en el manejo de

fitosanitarios. *Horticultura Argentina*, 19 (46) 5:14.

5. Bulacio, L.G.; Panelo, M.S.; Giolito, I.; Sain, O.; Giuliani, S.L.; Carlino, P.J. (2002). Estudio de la contaminación del personal aplicador de productos fitosanitarios. *Acta Toxicológica Argent.* 10 (1): 72 Resúmen.

6. Behmer, S.; Di Prinzio, A.P.; Magdalena, J.C.; Striebeck, G.L. (2001). Eficiencia de un equipo de protección personal para aplicaciones fitosanitarias en huertos frutales. *Agricultura Técnica* 61 (2) 221-228.

7. Bulacio, L.G.; Panelo, M.S. (ex-aequo); Giolito,

I. (ex-aequo); Sain, O.; Giuliani, S.L.; Carlino, P.J. (2001). Riesgo de contaminación personal en la aplicación de fitosanitarios en cultivo hortícola de bajo porte. *Horticultura Brasileira*, 19 (2):288. Resúmen.

8. Machado Neto, J.G.(1996). Segurança do trabalho com agrotóxicos-situação no cone sul. En: *Anais I Simposio Internacional de Tecnologia de Aplicação de Agroquímicos Águas de Lindóia*. Jaboticabal: Universidad Nacional Estado de San Pablo (UNESP) 145-157.

9. Pimentel Gomes, F. (1978). *Curso de Estadística Experimental*. 1era. Ed. Hemisferio Sur S.A.

OCCURRENCE OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* AND MICROCYSTINS IN RIO DE LA PLATA RIVER (ARGENTINA)

Andrinolo, Darío^{1,2}; Pereira, Paulo³; Giannuzzi, Leda^{1,2}; Aura, Claudia⁴; Massera, Silvia²; Caneo, Mariela²; Caixach, Josep⁵; Barco, Mónica⁵ and Echenique, Ricardo⁶.

- 1 - Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) Universidad Nacional de La Plata,
- 2 - Toxicología y Química Legal. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 116 (1900) La Plata, Argentina, TEL-54221-4254853.
- 3 - Laboratorio de Microbiología e Ecotoxicología, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge. Lisboa Portugal
- 4 - Departamento de Patología, Hospital. General San Martín. La Plata. Argentina.
- 5 - Mass Spectrometry Laboratory, Department of Ecotechnologies, IIQAB-CSIC, C/ Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain
- 6 - Departamento Científico Ficología, Museo de La Plata. Argentina.

Author for correspondence: dandrinolo@biol.unlp.edu.ar

Abstract: OCCURRENCE OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* AND MICROCYSTINS IN RIO DE LA PLATA RIVER (ARGENTINA). Darío Andrinolo; Paulo Pereira; Leda Giannuzzi; Claudia Aura; Silvia Massera; Mariela Caneo; Josep Caixach; Mónica Barco and Ricardo Echenique. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (1): 8-14*. This paper is the first report on microcystins producer blooms of *Microcystis aeruginosa* in the Argentinean coast of the Rio de la Plata river, the most important drinking water supply of Argentina.

The distribution of toxic cyanobacterium *Microcystis* cf. *aeruginosa* blooms in the Argentinean coast of the Rio de la Plata river was studied from December 2003 and January 2006. *Microcystis aeruginosa* persisted in the river with values ranged between 0 - 7.8 10⁴ cells ml⁻¹.

Samples of two *Microcystis aeruginosa* water blooms were collected at La Plata river and were analyzed by the mouse bioassay and by high-performance liquid chromatography with Diode-array and MS detector. The samples showed high hepatotoxicity in mouse bioassay and, in accordance, important amount of microcystins. The bloom samples contained microcystins LR and a variant of microcystin with a molecular ion [M+H]⁺= 1037.8 m/z as major components. The total toxin content found in these samples was 0.94 µg/mg and 0.69 µg/mg of lyophilised cells. We conclude that the presence of toxic clones of *Microcystis aeruginosa* in the Argentinean coast of the Rio de la Plata is an actual sanitary and environmental problem and that further studies are necessary to make the risk assessment

Key words: *Microcystis aeruginosa*; Bloom; Rio de la Plata; Hepatotoxins; Microcystin; HPLC-Diode array.

INTRODUCTION

Animal deaths after drinking water containing toxic cyanobacteria (blue-green algae) have been notified for over a century (1,2). In the last decade, toxic cyanobacterial blooms were frequently reported to appear in drinking water supplies causing serious troubles in water treatment plants and resulting in deleterious effects in wild and domestic animals and in the human population (3,4).

Cyanotoxins are classified into neurotoxins, hepatotoxins and skin irritants. Although both neurotoxins and hepatotoxins are distributed worldwide (5,6), are highly stable and exposure to these toxins has resulted in toxicity to animals and humans. The hepatotoxic cyanotoxins are produced by various genera such as *Microcystis*, *Anabena*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*. Most hepatotoxins are generally referred as microcystins (MCs), as they were first isolated from *Microcystis aeruginosa* (7).

MCs have a common structure containing three β-amino acids (alanine, β-linked erythro-β-methylaspartic acid, and α-linked glutamic acid), two variable L-amino acids, R₁ and R₂, and two unusual amino acids, N-methyldehydroalanine (Mdha) and 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyldeca-4,6-dienoic acid (Adda). To date, more than 60 microcystins have been identified (8),

being the main toxins MCLR and MCRR.

Exposure to MCs occurs orally, but can also occur through inhalation or through dermal exposure. Exposure to MCLR resulted in progressive degeneration of the liver in salmon smolts (Net Pen Liver Disease) in coastal waters of British Columbia, Canada, and the State of Washington, USA (9); livestock poisoning and death (10-12).

Human exposure to MCLR is primarily through ingestion of contaminated drinking water (13) and by recreational contact with contaminated water, by consumption of fish or blue green algae products from contaminated water, or accidentally through the use of MCLR-contaminated water as reported in Caruaru, Brazil, where renal dialysis patients exposed to MCLR had liver failure initially and finally death (Caruaru syndrome) (4). In a separate report, exposure to humans resulted in gastroenteritis and dermal contact irritations (14).

The Rio de la Plata basin is a vast area of 3.000.000 km² with more than 90 million inhabitants. It is the main source of drinking water for large cities located on its margins, such as Buenos Aires and Montevideo. During summer 1999, short-term blooms of *Microcystis aeruginosa* were observed in two locations on the Uruguayan coast of the Rio de la Plata near the city of Colonia (15). However, the cyanobacterial blooms on the Argentinean margin of the Rio de la Plata river as

well as the identity of the toxins presents in the toxic blooms at the Río de la Plata basin, has not been described to date.

The aim of this study was to study the abundance of *Microcystis aeruginosa*, toxicity and concentration of toxins in blooms in the Argentinean coast of the Río de la Plata river.

MATERIAL AND METHODS

Sampling and preparation of samples

Samples were collected in two station from a channel of La Plata port at its most internal zone (34° 50' 0.1"S, 57° 52' 49"W) and in the external zone of the port, in the Río de la Plata river (34° 52' 26"S, 57°53' 59") (Fig. 1).

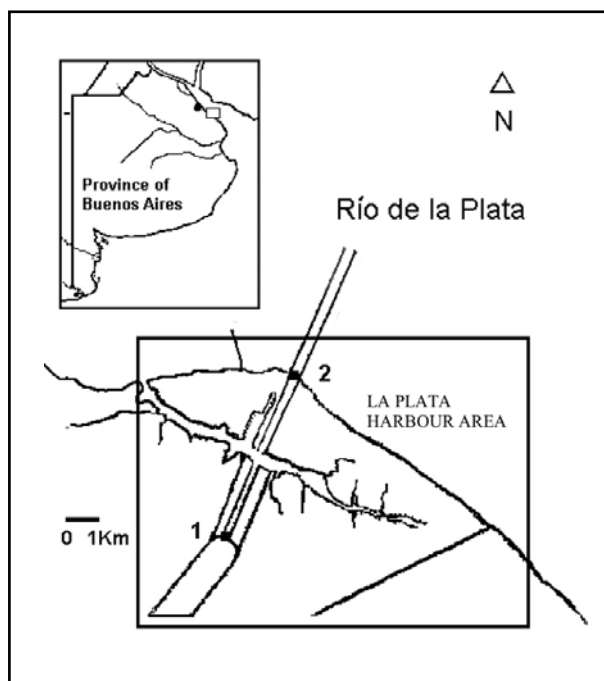


Fig 1: Río de la Plata river Map and La Plata harbor area with the location of sampling places 1 and 2.

Samples were collected at least one or twice a month from December 2003 to January 2006. Conductivity and pH were measured with Radiometer instruments in the laboratory at least within 1–2 h after the sampling. Temperature was performed by ORION probe system in the field. The samples were stored and transported to the laboratory on ice chest.

Qualitative studies of phytoplankton were performed on samples drawn from the reservoir with a 30 µm pore plankton net and analyzed "in vivo" with a photonic microscope Wild M20. For the quantitative analysis, samples were obtained with van Dorn bottles. Subsamples of net samples were also preserved in the field with acid Lugol iodine solution for the quantitative phytoplankton analysis and observed with an inverted microscope Carl Zeiss following Utermöhl's methodology (16).

Cells were concentrated by centrifugation (10 min, 3000 x g) and then lyophilized for toxicity tests, toxin extraction and HPLC-UV analysis for MCs.

Mouse bioassay for toxicity

Cyanobacterial freeze-dried cells (100 mg) were suspended in 10 ml of a 0.9% NaCl solution and tested for toxicity by mouse bioassay with ICR Swiss male mice (19.5 ± 0.5 g., media ± Desv. Est., n = 3). After intraperitoneal injection (ip), mice were observed continuously. Symptoms and survival times were recorded. Necropsies were done to detect signs of hepatotoxicity. Each liver was fixed in 10% (v/v) neutral buffered formalin. Tissue sections were cut and stained with haematoxylin and eosin.

Extraction and HPLC-UV analysis for microcystins

Lyophilised cells were extracted using the procedure described by Krishnamurthy et al., (17) with slight modifications. Briefly, the cells (100 mg) were extracted in 10 ml of buthanol/methanol/water solution (5:20:75, v/v/v) and maintained for one hour at room temperature by constant magnetic stirring. After homogenisation the extracts were centrifuged, the supernatants were kept and the cell pellets were re-extracted. Supernatants were combined and applied to a pre-activated Sep-Pak C18 ODS, (2 g, Waters). The toxins were eluted with 80 % methanol.

Reverse phase HPLC-UV was carried out with a Shimadzu HPLC pump (model LC-6A) connected to a silica based reverse phase C 18 column (Hypersil ODS 5 µm, 150x4,6 mm, Supelco Inc., Bellefonte USA). UV detection was performed at 238 nm with a photodiode array detector (Waters 996). The absorbance spectrum was scanned between 200 and 300 nm. As mobile phase, 0.05 M Phosphate buffer and methanol (58-42) pH 3 was used with a flow rate of 1 ml/min. All chemicals and solvents used were HPLC or analytical grade.

Microcystins RR-YR and LR were detected and quantified comparing peak retention times with the standards purchased from SIGMA chemicals (St Louis, MO, USA). Other MCs detected were quantified as LR equivalent.

Purification of toxins

Purification was performed with a semi preparative HPLC method. Briefly, cells were broken by 3 cycles of frozen and unfrozen, and the extract was cut with chloroform/methanol (50/50 v/v), the aqueous phase was concentrated and injected in a 500 µl loop. The High Performance Liquid chromatography system was HP 1100 with degassed module and diode array detector system. The preparative column utilized was TERMO Hyperprep HS C18 (250 x 10 mm) and the mobile phase was phosphate buffer (pH 7.0) with 30% acetonitrile, run in isocratic conditions at 5 ml/min,

detection UV-visible ($\lambda=238\text{nm}$). The peak corresponding to MCLR was collected separately, concentrated and desalted with a C18 cartridge previously activated. MCLR was eluted with a methanol/water solution (90/10) and the methanol was evaporated. The toxin was tested by HPLC-MS method.

Analysis by LC/ESI-MS

LC/ESI-MS analysis were performed on a system consisting of a liquid chromatograph (Gynkotek, Munich, Germany) coupled to a Navigator quadrupolar mass spectrometer (Finnigan, MassLab Group, Manchester, UK) with a coaxial electrospray source as previously described (18). Microcystin and nodularin separation was conducted on a Kromasil C18 column, 3.5 μm X 10 cm X 2.1. mm i.d. (Tracer, Teknokroma, Sant Cugat del Valle's, Spain). Mobile phases were Milli-Q water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.08% (v/v) formic acid. Separation was achieved at a flow rate of 200 ml min⁻¹ with the following gradient: 10–30% B 10 min, 30–35% B 20 min, 35–55% B 25 min, 55% B 5 min, 55–90% B 2 min, 90% B 3 min. LC/MS analysis were carried out in positive electrospray ionization mode. Full-scan mass spectra were performed from 500 to 1200 m/z at 3.00 s/scan in continuum mode. In selected ion monitoring (SIM) mode, eleven ions were monitored in continuum mode at 1.3 s/cycle with a dwell time of 0.10 s: 135.1 (characteristic fragment

ion of microcystins and nodularin), 519.8, 1038.6 (MCRR, [MC2H]2C and [MCH]C, respectively), 609.2, 610.2 (reserpine, [MCH]C and [MC2H]C, respectively), 825.5, 826.5 (nodularin, [MCH]C and [MC2H]C, respectively), 995.6, 996.6 (MCLR, [MCH]C and [MC2H]C, respectively), 1045.5 and 1046.6 m/z (mcyst-YR, [MCH]C and [MC2H]C, respectively). MCLR, -RR, -YR and nodularin standards were purchased from Calbiochem (La Jolla,) CA, USA). Standard solutions of each analyte were prepared in methanol and stored at -20°C. MCLR-RR-YR was identified on the basis of both its retention time and mass spectra. Toxins different from the available standards were tentatively identified by comparing the mass spectrum provided by this technique with those available in the literature. Since no patterns of possible microcystin variants detected in the sample are available, the identification of such variants has been performed based on data available in Sivonen and Jones (8). Quantitative analysis were carried out by external standard. Toxins different from MCLR, -RR, -YR was quantified related to MCLR. Calibration curves were calculated daily.

RESULTS

Microcystis aeruginosa existed in the Rio de la Plata river throughout the study and the abundance ranged between 0 and 7.8 10⁴ cells ml⁻¹ (Fig. 2). Two blooms were recorded in March 2005

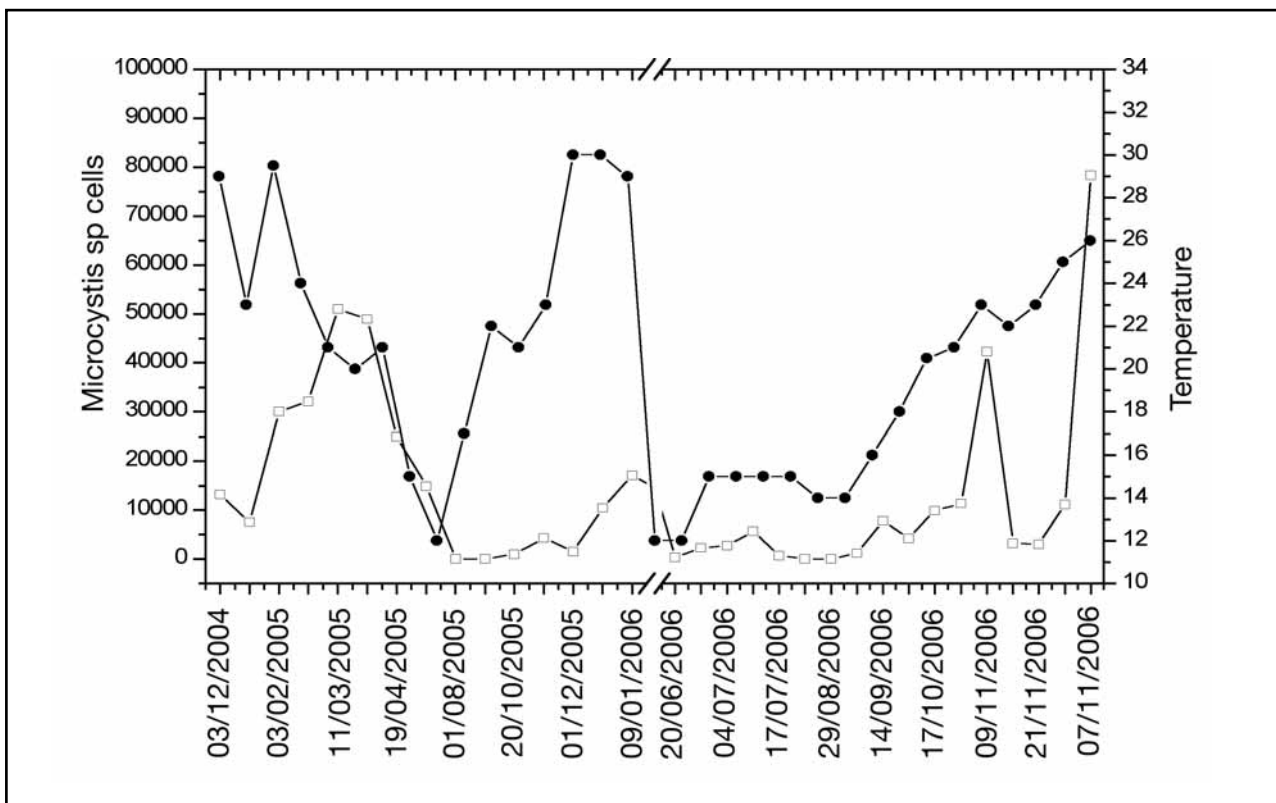


Fig. 2: The abundance of *Microcystis aeruginosa* (□) and temperature (●) in the internal zone of the Rio de la Plata River.

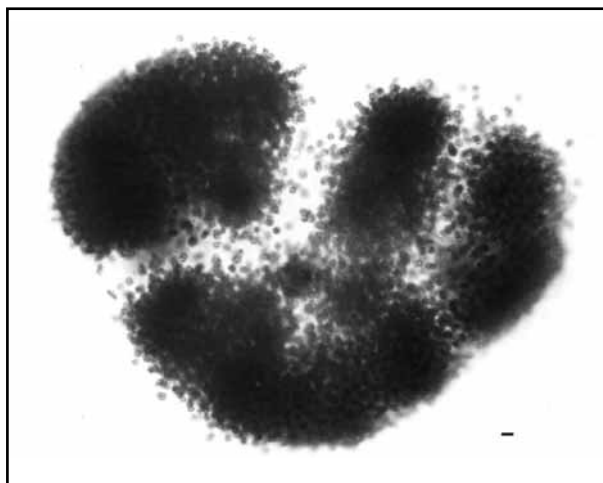


Fig 3: Microphotograph of *Microcystis aeruginosa* colony collected from a natural bloom. The bar indicates 10 μ m.

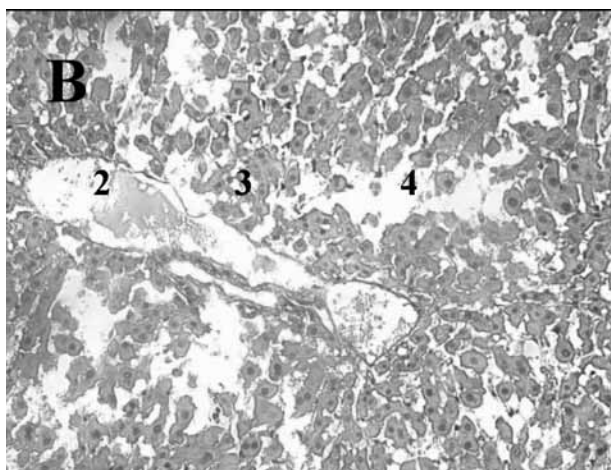
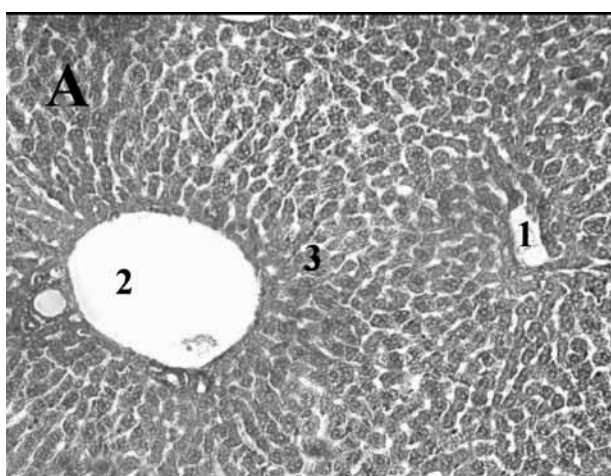


Fig 4: Representative microphotographs of hepatic slice from control mice (injected with saline solution) and treated mice (injected with cell extract). (A) control hepatic slice showed (1) Terminal hepatic venule (2) Normal portal tracts and (3) interface parenchyma in radiated disposition. (H-E 25X). (B) Hepatic slices from treated mice showed (2) Portal tracts enlarged due to important vasocongestion and (3) interface parenchyma disruption and (4) loss of parenchyma.(H-E 25X).

and December 2006, respectively (Fig. 2). Highest abundance was detected on December 2006 (7.8×10^4 cell ml^{-1}).

The surface temperature ranged between 12 and 29.5°C. Unlike the general trend, both March 2005 and December 2006 blooms occurred in summer, when the surface temperature was above 25°C (Fig. 2).

Cyanobacterial blooms were located along the shoreline looking for water discoloration and samples were taken from two places at the moment in which the blooms occurred. Microscopic analysis of both analyzed blooms revealed that the unique specie responsible for the blooms was *Microcystis aeruginosa* (Fig. 3). Physical parameters of the two analyzed blooms samples were: water temperature of 29 and 32°C, water conductivity of 678 μ S and 345 μ S and pH of 7.2 and 7.6 respectively.

The toxicity of the blooms was tested by the mouse bioassay and all the mice died after being intraperitoneally injected with one milliliter of *Microcystis aeruginosa* aqueous extract. The survival times were 40.6 ± 4.0 and 57 ± 12 minutes (mean \pm SD n =6) for places 1 and 2 respectively. Necropsies consistently revealed red swollen hemorrhage livers that weighted 65 % \pm 9.0 (mean \pm SD n = 6) more than those of the control mice.

The histopathological analysis of the livers dissected from the mice injected with microcystin extract, showed an alteration in the lobular architecture due to a loss of hepatic cells (Fig 4A and 4B). The remaining hepatocytes showed cytoplasmic microvacuolation, irregular shaped and sized nuclei, thick lumps chromatin and abundant amount of binucleated hepatocytes. The major tissue alterations that could be observed were portal tracts with shape alteration and vasocongestion; the interface parenchyma with partial disruption and dilated sinusoidal spaces. However, histopathological evidence for intrahepatic hemorrhage was not found.

Microcystins HPLC analysis of blooms samples revealed that the toxin composition was only slightly changed through samples places 1 and 2. Two major peaks that had retention times of 9.0 and 12.34 minutes respectively, were coincident with the retention times showed by standards of MCYR and LR and have the characteristic microcystin absorbance spectrum (Fig 5). To confirm the identity of peak 1 and 2 they were isolated by preparative chromatography and identified individually by mass spectrometry. Contrary to the result expected, the peak 1 did not correspond to MCYR and was identified as a variant of microcystin with a molecular ion $[M+H]^+ = 1037,8$ m/z. This microcystin could be [ADMAdda⁵]microcystin -LHar or [D-Leu¹]microcystin -LR (8). Peak 2 corresponded to MC LR in concordance with the result obtained by HPLC with diode array detection.

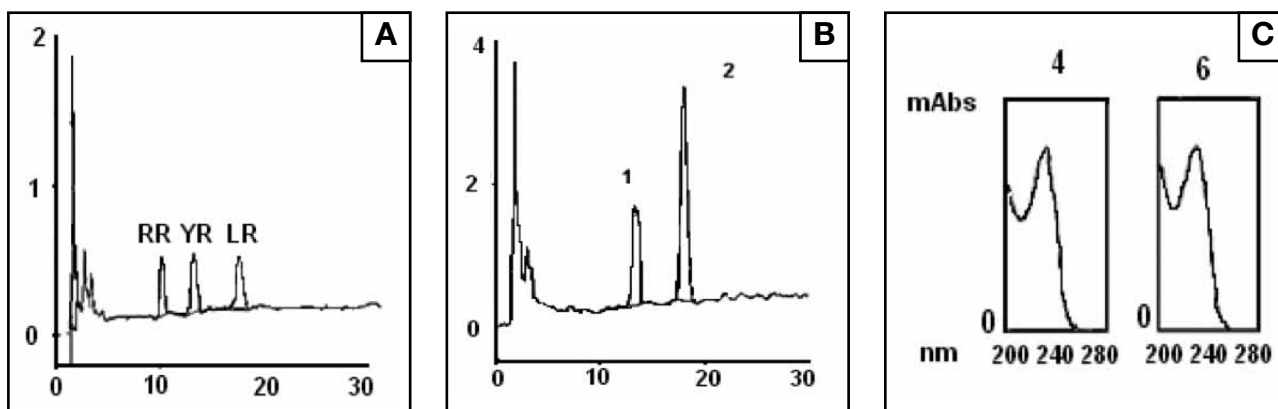


Fig 5: HPLC-UV Diode array analysis of (A) Microcystins standard mixture of MCRR, -YR and LR (1 μg each one), (B) *Microcystis aeruginosa* cells extract where two major peaks coincident with microcystin-YR and LR are presents (C) Spectrum traces of each peaks showing a characteristic absorbance of microcystins between 200 and 300 nm with a maximum absorbance at 238 nm.

DISCUSSION

Cyanobacterial blooms in the Río de la Plata river are frequent and generally occur in summer. In most cases *M. aeruginosa* is responsible for the formation of unspecific, widespread blooms with high cell densities (19,20). This phenomenon occurs in areas where human activity or pollution are intense, specially near urban centers, where anthropogenic inputs by domestic, industrial and urban discharges have been identified as the primary cause for the eutrophication in the Río de la Plata river. Reports of people suffering some kind of gastrointestinal disorder after bathing and swimming are quite frequent but not published. In fact, there are no epidemiological records available. Events of massive fish mortality associated to algal blooms, as occurred a few days before this study was carried out, are also typical.

The most common hepatotoxins in freshwater environments are microcystins, with 60 structurally different microcystins described (21). A toxic profile of the Río de la Plata river is showed for first time. Microcystin cells show two major components, with a characteristic absorbance spectrum of MCs, MCLR with 0.58 and 0.69 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of lyophilized cells in samples 1 and 2 respectively and the other microcystin (ADMAdda⁵]microcistina-LHar o la [D-Leu¹]microcistina-LR) present with 0.20 and 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of lyophilized cells in samples 1 and 2 respectively) are the first microcystins identified in the Río de la Plata river.

In a HPLC with diode array system for microcystin analysis both, time retention and spectrum absorbance constitutes condition of identity. This criteria of identity could be not sufficient and results in mistakes. In this case, the MCYR standard had the same retention time and spectrum than other microcystin (ADMAdda⁵]microcistina-LHar or [D-Leu¹]microcystin-LR). It is necessary to

incorporate more technology for the study of cyanotoxins in Río de la Plata river.

The MCs levels detected (0.93 and 78 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ of dry weight in samples 1 and 2 respectively) were similar to the values found in a toxin-containing bloom of *M. aeruginosa* in the Uruguay side of the Río de la Plata river (15). This finding suggests that this toxic phenomenon is widely spread in the Río de la Plata low basin. The high toxicities detected in the mice bioassay can be explained from the high content of toxins in the cell extract detected by HPLC analysis. In the mice bioassay were injected in 1ml of extract with 94 μg of microcystins. This is an i.p dose of 540 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, almost ten times higher than LD_{50} of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight estimated for microcystins (7).

The analysis of the livers dissected from the mice injected with MCs extract showed a disrupted lobular architecture and loss of hepatic cells without evidence for apoptotic process. A more intense colour was observed in the hepatocytes nuclei and also a higher number of cells with binucleation, in comparison with the control group. Both conditions due to an intense nuclear activity, suggesting that an intense process of cell reparation induced by microcystins take place.

By other hand, there were not histopathological evidences for the intrahepatic hemorrhage because there were not blood cells within the extravascular space as is expected when an intrahepatic hemorrhage occur. We conclude that the typical swollen liver observed in microcystin injected mice is due to vasocongestion.

CONCLUSION

This paper is the first report on microcystins producer blooms of *Microcystis aeruginosa* in the Argentinean coast of the Río de la Plata river, the most important drinking water supply of Argentina. The risk for human consumption of microcystins present in drinking

water is high due to the fact that the Río de la Plata river is the most important water supply for important cities such as Buenos Aires and La Plata; and that the conventional water treatment techniques actually used such as coagulation, sedimentation, filtration and chlorination could be not effective for removing microcystins. More studies are needed for evaluating the sanitary risk of *M. aeruginosa* blooms in the Rio de la Plata river.

ACKNOWLEDGEMENT

We want to thank to Lic. José María Guerrero for his critical review of the manuscript.

This study was supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), the Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) and the National University of La Plata

REFERENCES

1. Francis, G., 1878. Poisonous Australian Lake. Nature 444, 11-12.
2. Ringuelet, R.A., Olivier, S.R., Guarrera, S.A., Aramburu, R.H., 1955. Observaciones sobre antoplancton y mortandad de peces en la Laguna del Monte (Buenos Aires, República Argentina). Notas Mus. La Plata 18 (Zool. 159), 71-80.
3. Falconer, I.R., 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacterial. Phycologia 35, 6-11.
4. Jochimsen, E.M, Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B., Filho, D.A., Lyra, F.M., Barreto, V.S.T., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystin at a haemodialysis center in Brazil. New England Journal of Medicine 338, 873-878.
5. Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. J Appl. Bacteriol. 72, 445-59.
6. Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Sci. Amer. 270, 78-86.
7. Carmichael, W.W., 1988. Fresh water cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In Ownby C. L. and Odell. G.V. (eds). Natural Toxins. Pergamon Press. Oxford, 3- 16.
8. Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins- In: Chorus & Bertram, J (eds.) Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management, E & FN Spon, London, 41-111.
9. Anderson, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z.X., Holmes, C.F.B., Kent, M., LeBlanc, M., Taylo, F.J.R., Williams, D.E., 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon "Netpen liver Disease". Toxicon 31, 1315-1323.
10. Fitzgerald, S.D., Poppenga, R. H., 1993. Toxicosis due to microcystin hepatotoxins in three Holstein heifers. J. Vet. Diagn. Invest. 5,651-653.
11. Puschner, B. F., Galey, F. D., Johnson, B., Dickie, C.W., Vondy, M., Francis T., Holstege, D.M., 1998. Blue-green algae toxicosis in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213,1605-1607.
12. Beasley, V.R., Lovell, R.A., Holmes, K.R., Walcott, H.E., Schaeffer, D.J., Hoffmann, W.E., Carmichael, W.W., 2000. MCLR decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascularly dosed swine. J. Toxicol. Environ. Health A. 61,281-303.
13. Gupta, S., 1998. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. In: Guidelines for Drinking-water Quality, Addendum to vol. 2, Health Criteria and Other Supporting Information, Geneva, World Health Organization, pp. 95-110.
14. Rao, P.V., Gupta, N., Bhaskar, A.S., Jayaraj, R., 2002. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. J. Environ. Biol. 23,215-24.
15. De Leon, L., Yunes, J., 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* 2001 in the Río de la Plata river, South America. Environm. Toxicol. 16, 110 -112.
16. Utermöhl, H. (1958.) Vervollkommung der quantitative Phytoplankton Methodik. Mitt. Int. Verein. Limnol. 9, 1-38.
17. Krishnamurthy, T., Carmichael W.W., Sarver, E.W., 1986. Investigation of freshwater cyanobacteria (blue green algae) toxic peptides. I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos aquae*. Toxicon 24, 865-870.

18. Barco, M., Rivera J., Caixach, J., 2002. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 959, 103–111.

19. Guarrera, S. A., 1950. Estudios hidrobiológicos en el Río de la Plata. *Rev. Inst. Nac. Invest. Cienc. Nat. Mus. Arg. Cienc. Nat.*

“Bernardino Rivadavia”, *Bot.* 2, 1-62.

20. Gómez, N., Bauer, D.E., 2000. Diversidad fitoplanctónica en la franja costera sur del Río de la Plata. *Biología Acuática* 19, 7-26.

21. Chorus, I., Bartram, J. (eds) 1999. *Toxic Cyanobacteria in Water, A guide to their public health consequences, monitoring and management.* World Health Organization, E & FN Spon London. 416 p.

Calidad sin fronteras

Laboratorios Bagó,
empresa argentina,
reafirma su permanente
compromiso con la salud
y la innovación de
sus productos.

Esta filosofía sustentada
en más de 70 años de
trayectoria permite que
nuestros productos estén
presentes en 40 países
de todo el mundo.



Argentina
15:30

Rusia
21:30



**La Calidad Terapéutica se dice de muchas maneras,
pero tiene el mismo nombre en todo el mundo.**

Bagó

ÉTICA AL SERVICIO DE LA SALUD

HUMORAL IMMUNE ALTERATIONS CAUSED BY LEAD: STUDIES ON AN ADULT TOAD MODEL

Rosenberg, Carolina E.^{1,2}; Fink, Nilda E.¹; Salibián Alfredo^{2,3}

- 1 - Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina.
- 2 - Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires, 1900 La Plata, Argentina.
- 3 - Programa de Ecofisiología Aplicada, Universidad Nacional de Luján, Casilla de Correo 221, 6700 Luján, Argentina.

Corresponding author: Dra. Nilda E. Fink, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina, E-mail: fink@biol.unlp.edu.ar

Abstract: HUMORAL IMMUNE ALTERATIONS CAUSED BY LEAD: STUDIES ON AN ADULT TOAD MODEL. Carolina E. Rosenberg; Nilda E. Fink; Alfredo Salibián. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (1): 16-23*. There is evidence that environmental metal levels affect the immune function. In the particular case of the impact of heavy metals, information available suggests that the immune system is a target for low-dose Pb exposure. Among vertebrates it was shown that amphibians are capable of forming antibodies against a variety of antigens, causing several responses such as anaphylactic response and rejecting grafts. In this study, the production of antibodies was assessed against sheep red blood cells (SRBC) in the anuran *Bufo arenarum* after six weekly injections of sublethal doses of lead (50 mg.kg⁻¹, as lead acetate). Natural antibodies (natural heteroagglutinins) were also quantified against SRBC. Both assessments were carried out employing an ELISA method developed to this end, measuring absorbance (A). For natural anti-SRBC antibodies in both control (C) and Pb treated (T) toads, there was a non significant tendency to increase the initial absorbances (C initial: 0.69±0.39 A; T initial: 0.54±0.30 A), relative to those registered at the end of the experiments (C final: 0.89±0.49 A; T final: 0.76±0.31A); the T/C ratios also did not show changes. The only significant difference was found between initial and final samples from lead-treated toads (p<0.014). The immune anti-SRBC antibody levels of toads immunized with SRBC showed a significant lower increase (p<0.05) in lead-treated animals (T final: 0.66±0.36 A), as compared to control toads (C final: 0.91±0.50 A) at the end of the experiment. It was thus concluded that the changes due to the assayed doses of Pb in the levels of antibodies cannot be explained on the basis of only one single action mechanism of the metal, but as the result of a conjunction of effects over different immunocompetent cell subpopulations. These different responses suggest that factors affecting animals exposed to a foreign stimulus are different from those influencing the response of wild animals.

Key words: Sheep red blood cells (SRBC) antibodies; Heavy metals immunotoxicology; Sublethal lead; *Bufo arenarum*.

Resumen: ALTERACIONES INMUNES HUMORALES CAUSADAS POR PLOMO: ESTUDIOS EN UN MODELO DE SAPO ADULTO. Carolina E. Rosenberg; Nilda E. Fink; Alfredo Salibián. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (1): 16-23*. Existe evidencia de que los niveles de metal ambientales afectan la función inmune. En el caso particular del impacto de metales pesados, la información disponible sugiere que el sistema inmune es un blanco para la exposición a bajas dosis de Pb. Entre los vertebrados, se ha mostrado que los anfibios son capaces de formar anticuerpos contra una variedad de antígenos, que causan diversas respuestas, tales como respuesta anafiláctica y rechazo de injertos. En este estudio, la producción de anticuerpos fue evaluada contra eritrocitos de oveja (EO) en el anuro *Bufo arenarum*, luego de seis inyecciones semanales de dosis subletales de plomo (50 mg.kg⁻¹, como acetato de Pb). Los anticuerpos naturales (heteroagglutininas naturales) fueron también cuantificados contra EO. Ambas evaluaciones fueron llevadas a cabo empleando un método de ELISA desarrollado a este fin, midiendo la absorbancia (A). Para los anticuerpos anti-EO naturales, tanto en sapos controles (C) como en sapos tratados con Pb (T), hubo una tendencia significativa a incrementar las absorbancias iniciales (C inicial: 0,69±0,39 A; T inicial: 0,54±0,30 A); la relación T/C tampoco mostró cambios. La única diferencia significativa se encontró entre las muestras inicial y final de los sapos tratados con plomo (p<0,014). Los niveles de anticuerpos anti-EO inmune de sapos inmunizados con EO mostraron un bajo incremento significativo (p<0,05) en los animales tratados con plomo (T final: 0,66±0,36 A), al compararse con sapos control (C final: 0,91±0,50 A) al final del experimento. De este modo, se concluye que los cambios debidos a las dosis analizadas de Pb en los niveles de anticuerpos no pueden explicarse sólo sobre la base de un único mecanismo de acción del metal, sino como resultado de una conjunción de efectos sobre diferentes subpoblaciones de células inmunocompetentes. Estas diferentes respuestas sugieren que los factores que afectan los animales expuestos a un estímulo externo son diferentes de aquellos que influyen la respuesta en los animales silvestres.

Palabras claves: Anticuerpos de eritrocitos de oveja; Inmunotoxicología de metales pesados; Plomo subletal; *Bufo arenarum*.
Palavras chaves: Anticorpos de eritrócitos de carneiro; Inmunotoxicología de metais pesados; Chumbo subletal; *Bufo arenarum*.

INTRODUCTION

Immunotoxicology has become an issue of major interest over the last decade. Recently developed methods for toxicological assessment have involved the immune system as a target after exposure to some xenobiotics and drugs. The information on immunotoxicity studies in amphibian model is incomplete. There are various immunological assays available for evaluating the effects of environmental stressors on immunologi-

cal responses of amphibians (1,2). Among them, determining circulating immunoglobulin levels in serum is a useful endpoint in functional assays on the net result of a humoral immunological branch *in vivo*. This can be measured in wild animals (total immunoglobulins, Ig) or under experimental exposure to a specific antigen. Ectothermic vertebrates produce antibodies similar in structure and diversity to those of mammals (3,4). Amphibians are capable of forming antibod-

ies against a variety of antigens, causing an anaphylactic response and rejecting grafts (1,2,5-7). In earlier pioneer studies conducted on the anurans *Rana esculenta* and *Calyptocephalus gayii* on the detection of agglutinating or hemolytic activities against several antigens (animal erythrocytes and bacteria) were identified (8). A natural heterohe-moagglutinin was described in the serum of the *Bufo regularis* toad; this agglutinin for human erythrocytes appeared to have anti-(B+H) specificity (9). Jurd (10) showed that adult *Xenopus* serum contains a natural factor capable of lysing and agglutinating red blood cells (RBC) from many species. In addition, Fernández (11) found mild to low levels of hemolytic and agglutinating activity against mouse RBC in sera of different species of Argentine native anurans.

There is evidence that environmental metal levels affect the immune function. In the particular case of the impact of heavy metals on the immune system, the information available suggests that it is a target for low-dose Pb toxicity (12). Research including both in vivo and in vitro studies on animal models like rat, mouse, rabbit and fish, as well as humans, enabled documentation of the effect of Pb on humoral and cellular immunity (13-19). More recently, Chiesa et al. (20) have shown a significant increase in the heaviest fraction of serum globulins of *Bufo arenarum* injected with sublethal doses of lead, interpreting their finding as evidence of the compensatory immunostimulation effect of the metal.

Due to differences in the design of experimental protocols or tests used on different species, it is difficult to conduct an integrated analysis of the results obtained from studies of the effects of Pb on humoral immunity. For instance, the total level of antibodies in rat serum decreased after chronic exposure to the metal (21), but the same response did not occur when the assay was carried out on rabbits (22). Studies of the level of specific antibodies against an antigen in presence of Pb showed a reduction in serum titers in rats (23-26). In humans, special attention has been paid to occupational exposure, mainly in smelting industries, battery manufacturers, and mining activities. There is abundant information about the severe consequences of chronic exposure to Pb in people working in those industries. The relation between Pb concentration in blood (PbB) and some immunological parameters such as the levels of C3 and C4 components in the complement system, and IgG, IgA and IgM concentrations were studied in our country in adult human male exposed to the metal. Only C4 levels varied in line with PbB levels. In most cases, a negative Ig correlation was found, though this was positive in IgM, with very low PbB levels (27,28).

The levels of serum antibodies (IgG and IgM) in individuals exposed to Pb may decrease (29), or remain unchanged (17,30,31), although an increase in IgA in saliva was reported (30).

It has been suggested that Pb toxicity may be due, at least partially, to an autoimmune response, since the above mentioned type of disorders were observed in most of the affected target organs. Autoimmunity and hypersensitivity processes may be produced by a deregulation in the immune response. In both cases there is a change in the cellular T-helper 1 (Th1) and T-helper 2 (Th2) ratio that can be monitored, determining the pattern of cytokines produced by those two cellular types, i.e. interleukin 2, γ -interferon (Th1), and tumor necrosis factor or interleukins 4, 5 and 6 (Th2) (12). This study assessed the production of antibodies against sheep red blood cells (SRBC) in the anuran *Bufo arenarum* exposed to sublethal doses of lead (as acetate). Natural antibodies were also quantified against SRBC (natural heteroagglutinins).

MATERIALS AND METHODS

1 Animals

Eighty five adult *Bufo arenarum* male specimens (average weight 120 g) were collected in the neighborhood of La Plata, Argentina. Previous acclimatization was carried out keeping toads, individually, in plastic boxes containing tap-water, for a period of one week, at constant temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), and photoperiod (12D:12N). Blood samples were obtained by heart puncture under MS222 anesthesia, and received on heparin for lead measurement or without anticoagulant. Exuded sera were immediately centrifuged, aliquoted and stored at -20°C , until used within the following three months.

2 Preparation of polyclonal antibodies to *Bufo arenarum* globulin

Antibodies against globulin fraction, obtained by precipitation, were prepared in New Zealand white rabbits, after pre-immune serum sampling. An equal volume of toad globulin fraction was emulsified in complete Freund's adjuvant (Gibco Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) and injected subcutaneously. After 20 days, a second inoculation was performed. One week later, a first exploratory bleed was performed to test antibody production. Later, an intramuscular inoculation was performed using incomplete Freund's adjuvant for the preparation of the emulsions. A total of 10 boosters were given every 20 days, while different bleeds from the marginal ear vein were carried out to monitor antibody production. The anti-serum obtained was titrated using immunodotting and ELISA (32,33).

For the characterization of rabbit antibodies to *Bufo arenarum* globulins by immunoblotting, samples of normal toads' sera were denatured by heating at 100°C in sodium dodecylsulphate (SDS) for 2 min. They were then run on 7.5% polyacrilamide-SDS gels. Gels were stained with 0.125% Coomassie Brilliant Blue R-250 or electroblotted onto nitrocellulose membranes at 0.4 A, for 1.5 h

in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol, pH 8.3. Membranes were blocked with powdered 5% low fat skim milk in PBS-0.5% Tween 20, for 1 h at room temperature. An anti-*Bufo marinus* globulin antiserum was included in order to study the specificity of our antiserum by comparing it with another from other species of the same genus. These were therefore incubated with anti-*Bufo arenarum* globulin antiserum; others were incubated for comparison with anti-*Bufo marinus* immunoglobulin antiserum (34) as first antibodies. As a second antibody a anti-IgG rabbit serum, obtained from goat conjugate with horseradish peroxidase (HRP) (Sigma, Saint Louis MO, USA), was used. All sera were prepared in PBS-Tween-low fat powdered skim milk. The colour reaction was developed in presence of 4-Cl 1-naphthol dissolved in methanol with H₂O₂ in buffer Tris-NaCl. Membranes were washed with distilled water in order to stop the reaction and then dried.

3 Lead administration

Two Pb acetate and Na acetate solutions were prepared in distilled water. Experimental toads received a weekly injection of Pb acetate at a dose of 50 mg Pb . kg⁻¹, for six weeks, and control animals were injected at the same time with Na acetate. The injections were administrated in the dorsal lymph sac, at a rate of 0.6 ml . 100 g⁻¹ body weight. The dose of lead used was previously determined as sublethal at 20°C in our laboratory (35).

3.1 Quantitation of natural anti-SRBC antibodies

The optimal protocol established for the ELISA, modified after Hirvonen et al. (36) was as follows: in U-bottom plates, 100 µl/well of a SRBC suspension at 20x10⁶ in low ionic strength solution (LISS) (30 mM NaCl, 3 mM Na₂HPO₄, 0.24 M glycine, 0.02% azide, 1% BSA) was incubated, with 100 µl of *Bufo* serum successively diluted in LISS (dilution factor 2). After 30 minutes, the sensitized SRBC suspension was washed and then resuspended in 250 µl of 0.2% BSA-0.9% NaCl; 100 µl of the suspension were placed in each well in an ELISA plate, fixed with glutaraldehyde 0.3% and blocked with 2% BSA-0.9% NaCl. The plates were incubated during 1 h with anti-*Bufo arenarum* globulin serum in rabbit (1/4000, 100 µl/well), washed, and incubated for 1 h with the anti-rabbit globulin-HRP conjugate (1/2000, 100 µl/well). After washing, the substrate was added and read at 492 nm (32).

The assay included parallel titration of a commercial anti-SRBC rabbit serum as a positive control (Laboratorio Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina). Each sample was also tested without SRBC, anti-*Bufo arenarum* antiserum and conjugate-HRP and with pre-immune serum.

3.2 Immunization and quantitation of anti-

SRBC antibodies in *Bufo arenarum*

For the immunization protocol, an exploratory experiment employing a small number of animals was performed, based on the following steps: a) pre-immune sera: blood obtained by cardiac puncture, and sera separated by centrifugation; b) immunization protocol: the toads received 7 subcutaneous weekly injections of a 30% SRBC suspension in 0.9% NaCl physiological solution. Immune sera were separated twice from blood obtained by cardiac puncture 7 days after the 3rd and 7th injection. The reactivity of antibodies against SRBC was measured with ELISA in successively diluted sera in order to determine the end point.

3.3 Pb concentrations in the samples analyzed

Serum samples were stored at -20°C up to the moment of processing. Whole blood aliquots were digested with HNO₃ in a water bath at 70°C, following standard methods. They were then filtered through nitrocellulose filters (MSI 0.45 µm pore), carrying a final volume of 10 ml with distilled deionized Nanopure MiliQ water (Pb content <0.006 mg/l).

Lead was determined by atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectra AA 300) (Varian, Lexington MA, USA), by direct absorption in air-acetylene flame. The calibration curve was achieved by adding Pb nitrate solution to control samples with the same matrix as experimental samples, following the APHA-AWWA-WPCF specifications (37). The detection limit was 0.1 mg/dl. The lineal regression of the calibration curve was $y = -0.006 + 0.0575x$ ($r = 0.993$; $p = 0.007$). All the reagents used were of analytical grade. Results were expressed in mg/dl of blood.

4 Statistical analysis

Comparisons of antibody titers against SRBC of Pb-injected and control toads (ANOVA and *t* test), correlation test between blood Pb concentration and antibody titers, and normality tests were carried out using the StatgraphicsPlus statistical package (Manugistics Inc., Rockville MD, USA). H₀ was rejected when $p < 0.05$.

RESULTS

Data on immune response to Pb-injected animals are shown, and were obtained employing anti-*Bufo arenarum* Ig antiserum and developing an ELISA method to this end. Firstly, the response in lead-treated and control animals was followed up, applying an ELISA method on successive sera dilution; 1/200 dilution was then selected to perform statistical analysis. The efficiency of the immunization procedure and the specificity of the anti-Ig polyclonal antibodies were high (Fig. 1). Two bands were obtained, corresponding mainly to IgM, and light Ig antibodies. The titers obtained, followed up by immunodotting and ELISA, were 1/2000 and 1/4000, respectively.

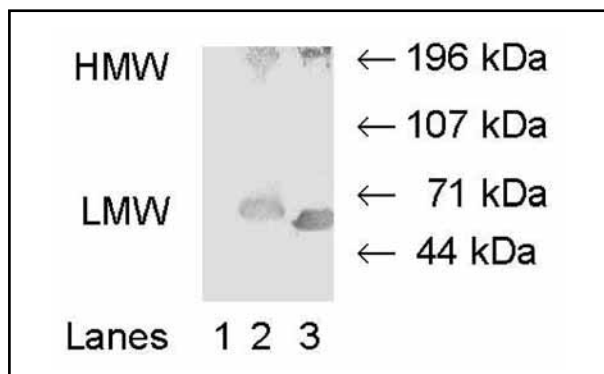


Figure 1. Specificity of antibodies obtained in rabbit to *Bufo arenarum* serum globulin fraction analyzed by immunoblotting. Lane 1: reactivity of preimmune rabbit sera (negative control). Lane 2: reactivity of *Bufo arenarum* antiglobulin antisera. Lane 3: reactivity of *Bufo marinus* antiglobulin antisera (positive control).

Table 1. Natural anti-SRBC antibody levels in adult male *Bufo arenarum*. ^a Initial time = day 1 of the experiment; final time = day 47 of the experiment.

Toads	Initial time ^a	Final time ^a
Control (C) (n=26)	0.69 ± 0.39	0.89 ± 0.49
Treated (T) (n=22)	0.54 ± 0.30 ^b	0.76 ± 0.31 ^c
T/C ratio	0.78	0.85

Data expressed as mean absorbances ± SD at 492 nm of sera diluted 1/200. Each pair of data (initial and final time) pertains to the same animal. Between brackets, number of toads. ANOVA $p < 0.03$; t test for mean comparison: b vs c: $p < 0.014$. Other comparisons were not significant.

Table 1 shows the average levels of natural anti-SRBC antibodies in *Bufo arenarum*, in both control and treated animals, at the beginning and end of the experimental period. When comparing initial and end absorbance changes, in samples of the same individual, the only significant difference was found in lead-treated toads, though significance was, in fact, only minimal. The treated/control ratios did not show changes. In comparing initial versus final absorbances for each group, a 29% increase was noted in controls and a 41% increase in Pb-injected toads.

The levels of anti-SRBC antibodies in 3 specimens of *Bufo arenarum* immunized with SRBC are shown in Table 2. In the three animals, titer increases between 30% and 90% were obtained. Table 3 shows the levels of immune anti-SRBC antibodies for *Bufo arenarum* immunized with SRBC, in both control and treated animals. Positive commercial control absorbance (anti-SRBC rabbit serum diluted 1/200) was 0.68 ± 0.23 (mean ± SD, n = 23). In this case also the treated/control ratios did not show significant changes. Table 4 shows the concentration of Pb in blood for *Bufo arenarum* after 6 weekly injections of 50 mg

Table 2. Results of an experimental approach to establish the protocol for *Bufo arenarum* immunization with SRBC. ^a Anti-SRBC antibody levels measured in duplicate in 3 adult male specimens of *Bufo arenarum*, immunized with weekly injections of 30% SRBC suspension.

Time	Toads		
	1	2	3
Initial (day 1, pre-immune control) (I)	0.96/ 0.94 ^a	0.58/ 0.65	0.79/ 0.78
Middle (7 days after the 3 rd injection)	1.18/ 1.17	0.81/ 0.84	1.05/ 1.10
Final (7 days after 7 th injection) (F)	1.26/ 1.23	1.16/ 1.17	1.25/ 1.28
F/I mean ratios	1.31	1.89	1.61

Data expressed as absorbances at 492 nm of sera diluted 1/200.

Table 3. Anti-SRBC antibody levels in adult male *Bufo arenarum* immunized with SRBC

Toads	Initial time*	Final time*
Control (C) (n=18)	0.52 ± 0.46 ^a	0.91 ± 0.50 ^b
Treated (T) (n=19)	0.42 ± 0.32 ^c	0.66 ± 0.36 ^d
T/C ratio	0.81	0.73

* Initial time = experimental day 1; final time = experimental day 47.

Data expressed as mean absorbances ± SD at 492 nm of sera diluted 1/200. Each pair of data (initial and final time) pertains to the same animal. In brackets, number of toads. ANOVA $p < 0.003$. t test for mean comparison: a vs b, b vs d, c vs d, $p < 0.05$. Other comparisons were not significant.

Table 4. Pb concentration in blood of adult male *Bufo arenarum* injected weekly with 50 mg Pb . kg⁻¹, for a period of 6 weeks.

Toads	Pb in blood (mg.dl ⁻¹)
Control (C) (n = 44)	2.2 ± 1.1
Treated (T) (n = 41)	8.2 ± 2.2
T/C ratio	3.73
p (C vs T) ^a	< 0.001

Data expressed as mean ± SD. In brackets, the number of toads. ^a t test.

Pb . kg⁻¹, compared with control toads that were given Na acetate.

The Pb concentration in blood of treated toads

increased almost four-fold. When comparing Pb level in immunized and non immunized animals, and anti-SRBC antibody titers (immune or natural) no significant correlations were found for each pair of data, in either the control or treated group ($p > 0.05$).

DISCUSSION

In amphibians, there are innate and adaptative immune responses that provide protection against foreign agents. The innate response includes antimicrobial peptides in the granular skin cells or in the gastrointestinal tract, phagocytic cells (macrophages and neutrophils), and complement system activated by both pathways. Also, they have NK cells that recognize and kill tumor cells or virus-infected cells. Valuable reviews of the amphibian immune system element have recently been published (1,2). The adaptive immune response in amphibians takes 7-14 days to develop after the detection of the antigens; it is slower and less specific than the response observed in mammals. The humoral-mediated immunity involves B-cells that in larvae and adults are differentiated mainly in spleen and secondarily in liver. There is likewise only weak recombination-activating gene (RAG) activity in bone marrow, indicating that B-cell differentiation has occurred. B-cells are not organized into distinct germinal centres, typical of ectothermic vertebrates, and may explain the lower diversity and binding affinity as compared to that found in mammals, though they do not have lymph node, but they have accumulations build up in adult gut and near the heart. These lymphoid areas in gut are B and plasma cells rich zones producing IgM, IgY, and IgX antibodies. In *Xenopus*, immunoglobulin genes organization and somatic diversification are similar to that found in mammals.

Information as to the effects of heavy metals on the immune system of amphibians is very limited (38-41), compared to the abundant amount of information regarding other species, mainly humans (19). In adult specimens of *Rana pipiens* and larvae of *Rana catesbeiana* exposed to sublethal doses of Cadmium, the immune response followed up by means of a hemoagglutinating assay showed an increase in the agglutination titers of SRBC (15,16). Pb may produce stimulation of certain immunological functions. It has been demonstrated that it can stimulate or inhibit several functions and structures of the immune system, depending on the dose and form of toxic administration.

It was observed that in *Bufo arenarum*, after weekly injections of 50 mg Pb . kg⁻¹, the production of natural antibodies increased significantly by 40%. In control toads of the experimental set, there were no significant differences between initial and final absorbances of sera during the experiment (Table 1). It is interesting to note that it has been proved that metal acts as a stimulating factor of B-lym-

phocytes in mice, producing an increase in the proliferative response of this lymphocytic subpopulation against mitogens (42,43) an increase in IgM production, and in the expression of class II histocompatibility molecules.

As mentioned previously, Pb has a stimulating effect on cellular lymphocytic populations, sometimes causing an increase in the production of antibodies. This effect, as well as other alterations produced by the metal, is highly dose-dependent. With low or mild concentrations it can be expected to stimulate the humoral immune response (44,45). With high doses instead, it can cause an inhibiting effect on the production of antibodies, possibly due to a direct toxicity of the metal on the B-lymphocytes (17).

There are several studies demonstrating an inhibition of the immune function caused by the metal. Müller et al. (46) showed, in mice chronically given Pb, that delayed hypersensitivity (DTH) against SRBC was suppressed, establishing a positive correlation between the inhibition to the primary and secondary responses to Pb concentration in blood. Waterborne Pb (acetate) produced in rats a decrease in the proliferative response to lymphocytes against mitogens, and in the DTH response (46,47). Luster et al. (21) reported that the response of antibodies against SRBC was depressed, while the proliferative capability of B-lymphocytes against LPS was not altered when rats were given different concentrations of Pb over a period of 7 weeks. In animals immunized with LPS, the IgM serum concentration increased, though not significantly. Williams et al. (48) showed that Pb bound to antibodies caused their inactivation in vitro.

In rats, a single dose of 1 mg Pb/100 g body weight increases the susceptibility to endotoxins of *Escherichia coli* (49) by a factor of 100,000. It has been demonstrated that lower Pb concentrations have a mitogenic effect on lymphocytes, stimulating their proliferation. However, at concentrations higher than 200 mg.l⁻¹ in drinking water, the metal has an immunosuppressive activity. The ATP and IP3 levels were increased in the lymphocytes from rats exposed in vitro to 50 mg.l⁻¹ Pb (acetate). This increase was independent of antigen receptor activation (50).

The number of antibody-producer spleen cells (mainly IgG) against SRBC diminished in mice exposed to different Pb (acetate) concentration in drinking water, with this response being interpreted as commitment of memory B-cells (51). In further studies, the same authors (45) showed that when the metal is administered in a single intranasal or intraperitoneal dose produced an increase in the primary immune response, and a decrease in the secondary response to the same antigen.

These facts may help to interpret the results reached on the amphibian model. Our results may contribute to a better understanding of the effects

of sublethal Pb on the immune system of amphibians. The natural antibodies are mainly IgM and can be considered as a primary response. Immune antibodies instead were quantified after a 6 weeks immunization protocol with the antigen; at the end of this period, all the toads displayed a positive response. Anti-SRBC immune antibody titers increased over time. In both groups, control (C) or treated (T) toads, the increase in antibody titers at the end of the experimental period was statistically significant, but the final titers were higher in C than in T (Table 3). In this case, the metal would have produced a lower increase in Ig production, comparable to the IgG in mammals, may be as a consequence of a failure to produce a response.

An alteration in the regulation of the secondary response to B-cells would explain the inhibition in the production of immune antibodies against SRBC, perhaps due to a deleterious action on the Th lymphocytes. Likewise, it has been suggested that Pb would alter the relation between the Th cell subpopulation Th1 and Th2, increasing the production of the cytokine Th2 pattern and diminishing the Th1 cell functions (20).

Thus it is concluded that the increase due to the assayed doses of Pb in the levels of natural antibodies cannot be explained on the basis of only one single action mechanism of the metal, but as the result of a conjunction of effects over different immunocompetent cell subpopulations. In contrast, the immune antibody levels in treated toads (Table 3), at the end of the experiments, showed a non-significant tendency, despite a significant lower increase as compared to controls. These different responses suggest that factors affecting animals exposed to a foreign stimulus are different from those influencing the response of wild animals. Finally it is worth mentioning that disturbances in amphibian populations caused by prolonged exposure to heavy metals, even at sublethal concentrations, can lead to important ecological consequences (52). In addition, such consequences can trigger a cascade of adverse secondary effects, affecting species at other trophic levels. Thus numerical decrease in amphibian populations, either larvae or adults, could mean substantial changes in other populations trophically related to them. A growing number of authors have been reporting evidences showing that numerous amphibian populations are declining worldwide (53), as well as in Latin America (54,55). Both natural and human-associated causes have been suggested to explain such declines. Obviously, no single cause can be unequivocally identified as the cause of the phenomenon, and the synergic effects of several environmental pollutants cannot be disregarded. Among those causes, the anthropogenic augmentation of heavy metals in the ecosystem compartments was clearly identified.

The adverse biological impacts of Pb are the consequence of its intrinsic toxicity as well as its long

environmental and biological half-life. It is found extensively dispersed in practically all parts of the ecosystems. Since toads have a biphasic developmental cycle, first in water and later on land, they are species particularly at risk of exposure to Pb.

In general, studies devoted to the effects of Pb on non-mammalian vertebrates are scarce (41). The scarcity of information as compared to other groups would seem to be more pronounced when referring to the impact of the metal on the amphibian immune system.

In this context, prolonged exposures to Pb may cause alterations to the immune system which, in turn, may lead to an increase in the susceptibility of animals to infections and infective factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Richard Whittington from the Elizabeth MacArthur Agricultural Institute, Menangle, Australia, for providing the anti-*Bufo marinus* serum, and Ms. Carina Apartin (CIMA-Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina) for her cooperation in Pb measurements. This work received the support of UNLP and CIC-Buenos Aires, Argentina.

This work is part of the Doctoral thesis of Dr. C. E. Rosemberg

REFERENCES

1. Fournier M., Robert J., Salo H.M., Dautremepuits C., Brousseau P. (2005). Immunotoxicology of amphibians. *Appl. Herpetol.* 2:297-309.
2. Rollins-Smith L. and Smits J.E.G. (2005). Amphibian models and approaches to immunotoxicology. In: Tryphonas H, M. Fournier, B.R. Blakley, J.E.G. Smits and P. Brousseau (eds). *Investigative immunotoxicology*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL. p 77-90.
3. Schluter S.F., Bernstein R.M. and Marchalonis J.J. (1997). Molecular origins and evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed vertebrates. *Immunol. Today* 18:543-549.
4. Zapata A.G., Varas A. and Torroba M. (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol. Today* 13:142-147.
5. Du Pasquier L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129:1-15.
6. Du Pasquier L., Schwager J. and Flajnik M.F. (1989). The immune system of *Xenopus*. *Annu. Rev. Immunol.* 7:251-275.
7. Horton J.D. (1994). Amphibians. In: Turner, R.J. (Ed.), *Immunology: a comparative approach*. John Wiley & Sons, New York, p. 101-136.

8. Wollman E. (1938). Recherches immunologiques sur les animaux inferieurs: I: Les proprietes humorales chez les grenouilles. Rev. Immunol. 4:101.
9. Balding P. and Gold ER (1976). The natural heterohemoagglutinin in the serum of the toad *Bufo regularis* and its relationship to lower vertebrate immunoglobulins. Immunology 30:769-777.
10. Jurd R.D. (1978) A natural heterohaemagglutinin in *X. laevis* serum. Immunology 34:389-392.
11. Fernández F.M. (1986). Actividad hemolítica y aglutinante natural en varias especies de anuros del Noroeste argentino. Acta Zool. Lilloana 38:211-213.
12. McCabe M.J. (1998) Lead. In: Zelikoff, J.T. and P.T. Thomas (eds) Immunotoxicology of environmental and occupational metals. Taylor and Francis, London, p. 111-129.
13. Anderson D.P. (1990). Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. Am. Fish. Soc. Symp. 8: 38-50.
14. Wester P.W., Vethaak A.D. and Van Muiswinkel W.B. (1994). Fish as biomarkers in immunotoxicology. Toxicology 86:213-232.
15. Zettergren L.D., Boldt B.W. and Schmid L.S. (1988). Cellular and serum immune response to dinitrophenol in adult *Rana pipiens*. Dev. Comp. Immunol. 12:99-107.
16. Zettergren L.D., Boldt B.W., Petering D.H., Goodrich M.S., Weber D.N. and Zettergren J.G. (2001). Effects of prolonged low-level cadmium exposure on the tadpole immune system. Toxicol. Lett. 55:11-19
17. Queiroz M.L.S., Perlingeiro R.C.R., Bincoletto C., Almeida M., Cardoso M.P., Dantas D.C.M. (1994). Immunoglobulin levels and cellular immune function in lead exposed workers. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 16:115-128.
18. Queiroz M.L.S., Costa F.F., Bincoletto C., Perlingeiro R.C.R., Dantas D.C.M., Cardoso M.P. and Almeida M. (1994). Engulfment and killing capabilities of neutrophils and phagocytic splenic function in persons occupationally exposed to lead. Int. J. Immunopharmacol. 16:239-244.
19. Zelikoff J.T. and Thomas P.T. (eds.) (1998). Immunotoxicology of environmental and occupational metals. Taylor and Francis, London.
20. Chiesa M.E., Rosenberg C.E., Fink N.E. and Salibián A. (2006). Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 50:384-391.
21. Luster M.I., Faith R.E. and Kimmel C.A. (1978). Depression of humoral immunity in rats following chronic developmental lead exposure. J. Environ. Pathol. Toxicol. 1:397-402.
22. Gainer J. (1974). Lead aggravates viral disease and represses the antiviral activity of interferon inducer. Environ. Health Perspect. 7:113-119.
23. Rosenberg H., McDonald T. and Modrak J. (1985). Influence of chronic lead ingestion on IgG subclass expression of the immune response to bovine serum albumin. Drug Chem. Toxicol. 8:57-58.
24. Stankovic V. and Jugo S. (1976). Supressive effect of lead on antibody response of rats to *S. typhimurium*. Period. Biol. 78:64-65.
25. Blakely B., Sisodia C. and Mukkur T. (1980). The effect of methyl mercury, tetraethyl lead and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 61:18-26.
26. Koller L.D., Roan J. (1980). Effects of lead, cadmium and methyl mercury on immunological memory. J. Environ. Pathol. Toxicol. 4:47-52.
27. López C.M., Urssi L.L., Piñeiro A.E., Avagnina A.M., Vidaña G., Alvarez S., Quiroga P.N., Villamil E.C. and Roses O.E. (1998). Inmunotoxicología de plomo: 4. Relación entre los niveles de complementos C3 y C4 y la plumbemia en poblaciones mayoritariamente expuestas al plomo. Acta Toxicol. Argent. [online] Available in <http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/Ata_2_98.pdf> [Accessed 19 Jan 2007].
28. Piñeiro A.E., Lockhardt E., Quiroga P.N., Schelotto L., López C.M., Villamil E.C. and Roses O.E. (1998). Inmunotoxicología de plomo: 5. Relación entre los niveles de las inmunoglobulinas G, A y M y la plumbemia en poblaciones mayoritariamente expuestas al plomo. Acta Toxicol. Argent. [online]. Available in <http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/Ata_2_98.pdf> [Accessed 19 Jan 2007]
29. Ünderger Ü., Basaran N., Canpinar H. and Kansu E. (1996). Immune alterations in lead-exposed workers. Toxicology 109:167-172.
30. Ewers U., Stiler-Winkler R. and Idel H. (1982). Serum immunoglobulin, complement C3 and salivary IgA levels in lead workers. Environ. Res. 29:351-357.

- 31.** Kimber I., Jackson J., Stonard J., Giidlow D. and Niewola Z. (1986). Influence of chronic low-level exposure to lead on plasma immunoglobulin concentration and cellular immune function in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 57:117-125.
- 32.** Hawkes R., Niday E., Gordon J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119:142-147.
- 33.** Elo M.T. and Fink N.E. (1996). Purification and partial biochemical characterization of an S-type lectin from blastula embryos of *Bufo arenarum*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 115:175-182.
- 34.** Whittington R.J. and Sparce R. (1996). Sensitive detection of serum antibodies in the cane toad *Bufo marinus*. *Dis. Aquat. Org.* 26:59-65.
- 35.** Arrieta M.A., Rosenberg C.E., Fink N.E. and Salibián A. (2000). Toxicidad aguda del plomo para *Bufo arenarum* a dos temperaturas. *Acta Toxicol. Argent.* 8:35.
- 36.** Hirvonen M., Tervonen S., Pirkola A., Sievers G. (1995). An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative determination of anti-D in plasma samples and immunoglobulin preparations. *Vox Sang.* 69:341-346.
- 37.** Clesceri L.S., Greenberg A.E. and Eaton A.M. (eds.) (1998). APHA-AWWA-WPCF: Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WPCF, Washington DC.
- 38.** Devillers J. and Exbrayat J.M. (eds.) (1992). Ecotoxicity of chemicals to amphibians. Gordon and Breach, Philadelphia.
- 39.** Linder G. and Grillisch B. (2000). Ecotoxicology of metals. In: Sparling D.W., Linder G. and Bishop C.A. (eds.). *Ecotoxicology of amphibian and reptiles*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL. p. 325-459.
- 40.** Schuytema G.S., Nebeker A.V. (1996) Amphibian toxicity data for water quality criteria chemicals. Corvallis, Oregon. U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research laboratory, Western Ecology Division (EPA/ 600/ R-96/124).
- 41.** Fink N.E. and Salibián A. (2005). Toxicological studies in adult amphibians: effects of lead. *Appl. Herpetol.* 2:311-333.
- 42.** Shenker M., Matarazzo W., Hirsch R., Gray I. (1977). Effect of trace metals in cultures of in vitro transformation of B lymphocytes. *Cell. Immunol.* 34:19-24.
- 43.** McCabe M.J. and Lawrence D.A. (1990). The heavy metal lead exhibits b cell- stimulatory factor activity by enhancing B cell Ia expression and differentiation. *J. Immunol.* 145:671-677.
- 44.** Lawrence D.A. (1980). Metal mediated modulation of B-cell proliferation and differentiation. *Fed. Proc.* 39:917.
- 45.** Koller L.D., Roan J.G., Exon J.H. (1976). Humoral antibody response in mice after exposure to lead or cadmium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151:339-342.
- 46.** Müller S., Gillert K.E., Krause C.H., Gross U., Läge-Stehr J. and Diamantstein T. (1976). Suppression of delayed type hypersensitivity of mice by lead. *Experientia* 33:667-668.
- 47.** Faith R.E., Luster M.I., Kimmel C.A. (1979). Effect of chronic developmental lead exposure on cell-mediated functions. *Clin. Exp. Immunol.* 35:413-420.
- 48.** Williams H.W., Caraway W.T. and De Young W. (1965). Inactivation of antibodies. *AMA Arch. Neurol. Psychol.* 72:579.
- 49.** Selye H., Tuchweber B., Bertok L. (1966). Effects of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. *J. Bacteriol.* 91:884-890.
- 50.** Razani-Boroujerdi S., Edwards B. and Sopori M.L. (1999). Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell-B cell interaction. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 288:714-719.
- 51.** Koller L.D., Kovacic S. (1974). Decreased antibody formation in mice exposed to lead. *Nature* 250:148-150.
- 52.** Sarkar S. (1996). Ecological theory and anuran declines. *BioScience* 46:199-207.
- 53.** Houlahan J.E., Findlay C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H. and Kuzmin S.L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752-755.
- 54.** Lips K., Young B., Ibañez R., Salas A. (2000). Amphibian declines in Latin America. *Froglog* (37):1-4.
- 55.** Heyer W.R. (2000). Amphibian declines and extinctions: the situation in Latin America. In: Péfaur J.E. (ed.). *Ecología latinoamericana*, Mérida, Venezuela, p. 47-55.

SEMINARIO - TALLER SOBRE SITIOS CONTAMINADOS CON PLOMO Y SALUD HUMANA Y JORNADAS NACIONALES DE EVALUACIÓN DE IMPACTO DE SITIOS CONTAMINADOS SOBRE SALUD Y AMBIENTE

**Universidad Nacional del Litoral,
ciudad de Santa Fe,**

23 al 25 de noviembre de 2006

**Jornadas Nacionales
de Evaluación de Sitios Contaminados
sobre Salud y Ambiente**

Santa Fe, 24 y 25 de Noviembre de 2006



RESÚMENES DE COMUNICACIONES LIBRES

UTILIZACIÓN DE ALGAS Y BIVALVOS COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

Adriana A. Pérez¹; Analía M. Strobl¹; Pablo M. Yofre¹; Perez Laura¹, Silvina Camarda¹; Clara M. López²; Adriana Piñero²; Otmaro Roses²; María A. Fajardo¹

1-Dpto. Bioquímica – Fac. Ciencias Naturales – CRIDECIT – UNPSJB. Comodoro Rivadavia. Chubut.- aaperez@sinectis.com.ar

2- Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

La utilización de organismos marinos para evaluar la calidad de los ecosistemas costeros tuvo un amplio desarrollo en los últimos 30 años. Las actividades industriales y urbanas han provocado un aumento no controlado del volumen de los desechos y de sus descargas en el mar. Estos procesos pueden ocasionar el aumento de contaminantes en el cuerpo hídrico y las diferentes especies que los habitan pueden emplearse como bioindicadoras de contaminación.

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de las algas *Porphyra columbina*, *Ulva* sp. y de los bivalvos *Mytilus edulis platensis* (mejillón) y *Aulacomia atra atra* (cholgas) de bioacumular plomo (Pb), cromo(Cr) y cadmio (Cd) y evaluar su utilización como bioindicadoras de contaminación de estos metales.

Los sitios de estudio fueron la desembocadura del Arroyo La Mata (provincia de Chubut) y Punta Maqueda (provincia de Santa Cruz) del Golfo San Jorge. Las muestras fueron digeridas por vía húmeda y los analitos se cuantificaron mediante espectrofotometría de absorción atómica -atomización electroterma en un equipo Varian AA840 provisto con inyector automático.

Ulva sp. concentró más el Pb y el Cr que *Porphyra columbina*. Esta última concentró más el Cd obteniéndose las máximas concentraciones (9,8 µg/g) durante el invierno.

Los bivalvos mostraron una capacidad semejante de bioacumulación de Cr y Pb puesto que entre ellos no existió diferencia estadísticamente significativa en cada lugar de muestreo y en la misma estación ($p > 0,05$).

No ocurrió lo mismo con el Cd ($p < 0,05$). Las concentraciones de metales encontradas en las especies estudiadas en los dos lugares del Golfo pueden considerarse niveles base para la prevención y el estudio de probables impactos de origen antrópico.

Dada sus distintas capacidades de bioacumulación, el uso de las cuatro especies permitiría obtener un cuadro más completo de la contaminación ambiental por metales pesados.

INVESTIGACIÓN DE PROBABLE CONTAMINACIÓN POR PLOMO EN ESCOLARES. SAN ANTONIO OESTE. RÍO NEGRO. ARGENTINA. ENERO 2006

Cabrera A.; Castañeda I.; Mañana A.; Echenique H.; Roques L.; Goya F.; Larreau G.¹; García S.²

1- Carrera de especialización en epidemiología de campo, Ministerio de Salud de la Nación.

2- Programa Nacional de Prevención y Control de Intoxicaciones, Ministerio de Salud de la Nación.

Antecedentes:

Desde 1994 se han realizado estudios en San Antonio Oeste, que demostraron la existencia de contaminación por plomo en suelo, polvo, agua y sedimentos por depósitos de escoria de una antigua fundición. El objeto del presente estudio fue estimar la prevalencia de plumbemia elevada en escolares y su relación con factores de exposición ambientales.

Métodos:

Se realizó un estudio de corte transversal, con muestreo aleatorio estratificado. Se determinó la concentración de plomo en sangre por medio de espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito.

Se aplicó una encuesta clínico epidemiológica indagando sobre factores de riesgo. Para evaluar la asociación de los factores se utilizó un análisis univariado.

Resultados:

Fueron incluidos 197 escolares. La mediana de la concentración de plomo fue 5.95 µg/dl (rango intercuartil 3.7 – 8.7); el 20% de los escolares (39/197) presentaron valores de plumbemia igual o mayores a 10 µg/dl. No se halló una asociación estadísticamente significativa entre los factores de exposición estudiados ($p > 0,05$) y los valores de plumbemia > 10 .

Conclusiones:

No se hallaron evidencias de que los factores de exposición considerados tuvieran relación con los valores altos de plumbemia. Sin embargo, estos valores son similares a los encontrados en otros países latinoamericanos que presentan sitios contaminados con este metal. Estos resultados indican la necesidad de continuar con el estudio de factores de riesgo e implementar medidas ambientales para limitar la dispersión del contaminante y remediación del sitio; junto con medidas nutricionales y educativas para disminuir la vulnerabilidad de los niños.

ESTUDIO DE MORTALIDAD POR CÁNCER EN LOS PARTIDOS DE QUILMES Y BERAZATEGUI. Años 1999 – 2003. INFLUENCIA DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE FRECUENCIA EXTREMADAMENTE BAJA

Luccioli de Sobel, N.; García, S.; De Pietri, D.
dpietri@msal.gov.ar

El caso que nos ocupa tiene su origen en las denuncias de vecinos del Municipio de Berazategui sobre una mayor incidencia de casos de cáncer en torno a la Subestación Sobral (en la localidad de Ezpeleta, partido de Quilmes), que atribuyen a la posible influencia de campos electromagnéticos y que ha dado lugar al llamado "mapa de la muerte", referido a la existencia de aproximadamente 80 casos de defunciones por cánceres de diferentes localizaciones, en las inmediaciones de la subestación.

El estudio, de tipo descriptivo, da cuenta de la magnitud, frecuencia y distribución por sexo, edades y localidades de las defunciones ocurridas por cánceres de diferentes localizaciones anatómicas, analizando especialmente el comportamiento de aquellos tumores malignos que la preocupación pública o algunos investigadores han buscado asociar a la exposición a los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja.

La Razón de Mortalidad Estandarizada (RME), en ambos partidos y en la localidad de Ezpeleta fue inferior a "1", en ambos sexos, indicando que el número de muertes observadas fue inferior al número de muertes esperadas en varones y mujeres, si éstos presentaran las tasas de mortalidad específica por edad de las poblaciones de Provincia de Buenos Aires y Argentina, consideradas como tasas estándar.

En Ezpeleta, se calcularon las RME para los cánceres seleccionados, que según la literatura actualizada consultada podrían estar relacionados con la exposición a CEM-FEB. En todos los casos, excepto Linfoma No Hodgkin en varones, muestran cifras inferiores a la unidad en varones y mujeres, reflejando el menor número de defunciones observadas, comparado con el que se esperaba ocurrieran en Ezpeleta si la experiencia de mortalidad fuera la observada en Buenos Aires y en total país.

A partir del análisis de las Razones Estandarizadas de Tasas de Mortalidad por Cáncer según Sitio Único, por Localidad, se construyó un índice de excesos de cáncer, para establecer un ranquin entre las localidades. Asimismo se construyó un índice de vulnerabilidad a partir del % de superficie afectada por subestaciones y cables de alta tensión, para reflejar la potencial exposición ambiental a los CEM;

El análisis de la confrontación entre el índice de vulnerabilidad con el índice de excesos de mortalidad por cáncer de las localizaciones anatómicas seleccionadas, mostró que no es posible asociar los incrementos en el número de cánceres específicos a las CEM con el aumento de superficie bajo afectación de subestaciones y /o cables de alta tensión.

ESCENARIOS DE RIESGO POBLACIONAL POR IMPACTO DE CONTAMINANTES EN CALIDAD DE AIRE. MUNICIPIO DE VICENTE LOPEZ

De Oto, L.¹,*Romero C.²; Aguirre, J.¹; Messina, V. ; Iriarte M¹

1-Secretaría de Salud del Municipio de Vicente López-
Dirección de Salud Ambiental

2-Comisión Nacional de Energía Atómica – Grupo Monitoreo Ambiental.

*e-mail: luciodeoto@fibertel.com.ar

El presente trabajo tiene con objetivo, evaluar las vivencias y metodologías aplicadas por el equipo, en la gestión de Calidad de Aire, en 3 escenarios de riesgo; periodo 2004-2006.

Las dos primeras vivencias se relacionan con el área industrial. En la primera experiencia, reactiva, se evaluó en la población- objetivo la problemática en salud y medio ambiente. Se realizaron las determinaciones de P.M. 2,5 ; fenoles formaldehído; ácidos y metales y estudios histológicos de las hojas con necrosis. La segunda vivencia, preventiva, se relacionó con el estudio de plomo en sangre de 100 embarazadas y 100 recién nacidos residentes, con la correspondiente determinación de Pb en aire y suelo. La última, tiene relación con una área de alto tránsito vehicular, donde se priorizó en esta etapa, el estudio de PM 2,5 y del Benceno ; a 1,60 metros intra-extramuros de un colegio y negocios; como así el estudio de biomarcadores en la población de más riesgo. Vivencias con la participación de Universidades y Centros de Investigación Nacionales en la detección de grupos vulnerables y evaluación de sustancias tóxicas presentes; que actuarían durante la ventana de vulnerabilidad del desarrollo del niño.

NIVELES DE METAHEMOGLOBINEMIA EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA A NITRATO EN AGUA DE POZO EN UN BARRIO DE CÓRDOBA

Gait N, Frías M, Llebeili R, Suárez A, Jarchum A, Giovo M, Odierna E

Hospital de Niños de la Santísima-Córdoba, bajada Pucara esq. Ferroviarios CP: 5001
e-mails: Nilda.Gait@cba.gov.ar

Los nitratos y nitritos aparecen en suelo, aguas superficiales y subterráneas por la acción microbiana. En los primeros meses de vida del lactante su estómago no produce gran cantidad de ácidos, favoreciendo el asentamiento de bacterias en intestino delgado, transformando los nitratos ingeridos en nitritos, formando metahemoglobinemia. Objetivos: Definir los niveles de metahemoglobinemia en una población expuesta a nitratos de agua de pozo en un barrio de Córdoba. Satisfacer en forma eficiente la demanda de un grupo poblacional y determinar riesgos y daño a la salud a corto, mediano y largo plazo. Material y método: Investigación exploratoria, descriptiva, prospectiva y comparativa. Población: La muestra esta formada por 105 personas expuestas al contaminante que asistieron voluntariamente a la realización de estudios clínicos toxicológicos y de laboratorio siendo seleccionado uno de los barrios afectados por la problemática. Resultados: Los 105 pacientes asistieron a la segunda toma de muestra y control clínico y solo en 44 pacientes se observó una disminución de los valores de metahemoglobinemia y mejoría clínica a los 30 días luego del primer muestreo (77% a 27%) al retirarse la fuente de exposición; los síntomas predominantes fueron dérmicos 23%, gastrointestinales 38%. Conclusión: La población asintomática o con síntomas leves entre 0-5 y 25-75 años, mostraron valores de metahemoglobina por arriba de los niveles normales; después de este estudio surgen medidas de remediación por organismos gubernamentales, quienes deciden la conexión a una red pública de agua y evaluación en el término de 1 año a la población expuesta.

SITUACIÓN SANITARIA DEL BASURAL CANTERA NATAL CRESPO, LA CALERA, CÓRDOBA, ARGENTINA

Giunta S, Pierotto M, Gait N.

Hospital de Niños de la Santísima Trinidad.
Ferroviario y Bajada Pucará. CP: 5000 Córdoba.
E-mail: xy0068@yahoo.com.ar

El basural se encuentra ubicado a 22 km de la ciudad de Córdoba, sobre el cordón de las denominadas Sierras Chicas, localizado en antiguos socavones de canteras rodeado de una vegetación típica del arbustal y bosque serrano. El objetivo del presente trabajo es realizar un informe técnico de la situación sanitaria del basural orientado a la búsqueda de residuos patógenos. Para la inspección del sitio, se empleó la metodología sugerida por la OMS/ATSDR donde se realizaron las siguientes actividades: visita al predio, localización geográfica mediante la utilización de fotografías aéreas y satelitales, toma de fotografías, apertura de bolsas de residuos, visita a los centros de salud y entrevistas con vecinos. En el basural propiamente dicho se encontraron los siguientes ele-

mentos: animales en proceso de descomposición, material orgánico producto de poda, bolsas de plásticos vacías, residuos orgánicos domiciliarios, etc. No se encontraron residuos patógenos superficiales en esta visita. Este sitio constituye un importante foco infeccioso que puede presentar graves implicancias para la salud de poblaciones vecinas, debido a la heterogeneidad de sustancias encontradas, y a su potencial migración y transporte al ambiente. Consideramos que este basural debería ser erradicado, implementando soluciones alternativas como: campañas de educación y concientización, separación de basura domiciliaria, tecnologías de reciclado y rellenos sanitarios a los fines de garantizar la calidad de vida preservando la salud de las poblaciones a un bajo costo ambiental.

COMPUESTOS VOLATILES HALOGENADOS EN LECHE DE TAMBOS E IMPACTO SOBRE LA SALUD

Juan C. Andini¹, Silvina Addona¹, Marcelino R. Freyre², Victor Rozycki², Gerónimo E. Heer^{3*}, Hugo A. Taher⁴

1-SECEGRIN-CERIDE-CONICET - Güemes 3450 - 3000 - Santa Fe.

2-Instituto de Tecnología de alimentos, Facultad de Ingeniería Química.

3-Facultad de Ciencias Veterinarias, 4Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL * geheer@arnet.com.ar

Los compuestos orgánicos volátiles y en particular los trihalometanos son una preocupación permanente para investigadores y tecnólogos, en el sentido que poseen un potencial de riesgo sanitario y pueden producir cáncer y defectos relacionados con la gestación.

Actualmente en Argentina, hay aproximadamente 12.000 tambos, 1.600.000 vacas en ordeño que producen un promedio de 17 litros de leche por día, lo que permite estimar una producción de 10.200 millones de litros para 2006.

En cuanto a la higiene del equipamiento de tambo, el 100% de los tambos utiliza productos combinados (detergentes alcalinos combinados con cloro), estos pueden ser líquidos con hipoclorito de sodio y sólidos con ácido tricloroisocianúrico. A su vez, más de un 60% de los tambos utiliza hipoclorito de sodio para la desinfección del equipo de ordeño y del tanque de frío.

Hay pocos tambos que utilizan cloro como pre dipping (desinfección de los pezones antes del ordeño) y como post dipping se utiliza en un 80% productos en base a yodo, el resto utiliza ácido láctico, clorito de sodio combinado con ácido láctico, cloro y otros no hacen desinfección de pezones. Para el análisis de compuestos halogenados volátiles, en particular de cloroformo, presentes como trazas en la leche, la microextracción en fase sóli-

da y cromatografía gaseosa permiten realizar un relevamiento preliminar sobre tambos caracterizados. Se discuten las implicancias de estos resultados y se proponen vías alternativas para minimizar o prevenir la presencia de estos residuos en leche.

EXPERIENCIAS EN ENCUESTAS SOBRE PROBLEMÁTICAS AMBIENTALES DEL MUNICIPIO DE VICENTE LOPEZ

Iriarte M. C *; Apolonio G.; Swiecky C.; Iriarte A.; De Oto L.

Dirección de Salud Ambiental: Municipio de Vicente López; Argentina. Email *: maryiriart@hotmail.com

La creación de la Dirección de Salud Ambiental surge como necesidad de la Secretaría de Salud del Municipio (año 1999), para realizar programas de prevención y evaluación del riesgo en la salud humana. Para dicho objetivo se incorporaron al equipo primario, personal capacitado en la realización de encuestas. Entre las acciones específicas de dicho personal, se puede citar: Evaluación del nivel de percepción en la problemática de salud y medio ambiente barrial; Participación con un equipo multidisciplinario en el diseño de las encuestas sobre cada una de las problemáticas a evaluar; Recepción y contención de las denuncias provenientes de los vecinos y participación de proyectos preventivos.

Los dos escenarios de riesgo evaluados fueron : a) Contaminación de agua subterránea con cromo (VI), con posible riesgo en la red de agua potable; b) Contaminación de la calidad de aire, por percepción de los vecinos de olores, humos, daños en las plantas y signos / síntomas.

A su vez se diseñó un programa de prevención de plomo con sus correspondiente encuesta de percepción de riesgo en embarazadas y neonatos en áreas fabriles en forma conjunto con el personal de la Maternidad de Santa Rosa (Municipio de Vicente López)

Las metodologías aplicadas en las encuestas permitieron aportar la información base para realizar los posteriores estudios de biomarcadores en humanos, contaminantes en aire y agua, evaluación del riesgo y la toma de decisión, para diseñar las acciones específicas en la remediación de los sitios contaminados y a su vez realizar las campañas correspondientes de prevención.

DETERMINACIÓN DE CLOROFORMO EN LECHE UTILIZANDO MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA (SPME) Y CROMATOGRAFIA GASEOSA

Juan C. Andini^{1*}, Silvina Addona^{1*}, Marcelino R. Freyre², Victor R Rozycki², Hugo A. Taher³

1-SECEGRIN-CERIDE-CONICET - Güemes 3450 - 3000 - Santa Fe.

2-Instituto de Tecnología de alimentos, Facultad de Ingeniería Química - Universidad Nacional del Litoral.

3-Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.

*e-mail: saddona@ceride.gov.ar

El cloroformo, que es un constituyente de los compuestos orgánicos volátiles, posee un potencial riesgo sanitario al ser considerado cancerígeno. Además, puede provocar abortos espontáneos, y otros relacionados con la gestación.

El cloroformo se encuentra como parte de los subproductos de la cloración debido a la necesaria desinfección de los tanques de almacenamiento de leche.

La metodología descrita en distintos trabajos para la determinación de cloroformo debe ser selectiva y de alta sensibilidad, por lo que utiliza entre otros, dispositivos del tipo purga y trampa.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y puesta a punto de una metodología para el análisis de trazas de cloroformo en leche utilizando microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa como técnica alternativa de bajo costo, sencilla y rápida.

La extracción de cloroformo de la matriz propuesta se realiza sobre el espacio de cabeza (Headspace) de un vial mediante el dispositivo de SPME. Los parámetros de la extracción que hacen a la optimización de la técnica son: tipo de fibra absorbente, temperatura y tiempo de agitación empleado, volúmenes de muestra y las condiciones cromatográficas (tipo de inyección, programa de temperaturas, etc.)

Para obtener curvas de calibrado, se analizan las muestras con el agregado de los patrones, utilizando las condiciones óptimas de extracción halladas.

La técnica de microextracción en fase sólida es económica, rápida y permite mejorar los límites de detección.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

- Página 1: título, subtítulo, nombres completos de o de los autores, laboratorio o institución donde se realizó el trabajo, dirección postal completa, incluyendo código postal, correo electrónico, teléfono y fax, autor al cual debe dirigirse toda la correspondencia.

- Página 2: título del trabajo en castellano e inglés y resúmenes de hasta 250 palabras en castellano e inglés. Tres - cuatro palabras clave en castellano, portugués e inglés.

- Página 3 en adelante: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Bibliografía citada, Leyendas de Ilustraciones y Tablas con leyenda.

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

Las comunicaciones breves deberán respetar un formato similar al indicado para las contribuciones científicas exceptuando el resumen en español. El texto no necesariamente se dividirá en las partes indicadas (Introducción, Material y Métodos, etc.); no obstante deberá contener en forma concisa la información que corresponde a esas partes. La extensión de esta categoría de aportes no deberá superar las 3 (tres) páginas.

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

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

Las notas técnicas se referirán exclusivamente a modificaciones de métodos, determinación de errores de las mismas, etc. Su extensión no superará las 2 (dos) páginas; al final deberán constar los datos que identifiquen claramente al autor/es.

Las cartas al Editor serán textos de una extensión no mayor de doscientas palabras y revestirán el carácter de correspondencia científica referida a textos publicados con anterioridad. El o los autores serán debidamente indicados.

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

- En todos los casos se deberá consignar en el ángulo superior derecho de cada hoja el apellido del autor o del primer autor y el número correlativo que corresponda, incluidas las páginas con Tablas.

- En el caso de sustancias químicas se tomará como referencia prioritaria a las normas de la IUPAC.

- Los organismos se denominarán conforme a las normas internacionales, indicando sin abreviaturas el género y la especie en itálicas o subrayados.

- Las ilustraciones (fotografías, gráficos) deben ser confeccionadas sobre materiales de alta calidad, con técnicas que permitan su reproducción sin tratamientos especiales. Es aconsejable que este material tenga las dimensiones de la caja de Acta; los autores deben tener presente que en los casos de ilustraciones en las que sea necesario proceder a su reducción, el tamaño de las letras, números y demás elementos de las mismas deben tener dimensiones mayores para que la nitidez no se vea afectada luego de la impresión.

Se enviarán un juego de originales y dos copias. Cada una de las ilustraciones deberá portar en el dorso, escrito con lápiz suave, el número que le corresponde, nombre del primer autor y mediante una flecha se indicará la posición superior. Las leyendas irán en hoja aparte.

Los costos adicionales que pudieran ocasionarse por la edición de dicho material serán a cargo del autor.

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

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

- Las citas bibliográficas en el texto se indicarán mediante números correlativos, por orden de aparición, entre paréntesis; por ejemplo: "la separación de las isoenzimas se hizo por electroforesis de acuerdo a la técnica de Dietz y Lubtano (4)"

En el caso de citar artículos de más de dos autores, se indicará el apellido del primero seguido de la expresión et al.: "Castañé et al. (5) fueron los primeros en..."

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

El formato de las citas es el siguiente:

Artículo en publicación periódica:

"Malla Reddy, P. and Bashamohideen M. (1989). Fenvalerate and cypemmerhrin induced changes

in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochim. Hidrobio. 17 (1), 101-107"
Libro: "Dix, H.M. (1981), Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."

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

- Cualquier modificación excepcional de las normas estipuladas que los autores soliciten será considerada por el Director.

- Las pruebas de galera se enviarán al autor indicado como receptor de la correspondencia. Las mismas serán revisadas y devueltas dentro de las 48 horas de recibidas.

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

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

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

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) is the official journal of the Asociación Toxicológica Argentina (Argentine Toxicological Association) for scientific diffusion.

Acta Toxicológica Argentina (herein below "Acta") is basically aimed at publishing original full-length papers, short communications, reports on research in progress or review papers, topics of interest to workers in Toxicology, book reviews, technical communications as well as letters to the Editor. News relevant to the different fields of Toxicology will also be published.

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

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

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

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

Portuguese and English should be included.

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

Full-length papers should not exceed eight pages. Text should be typed with PC, on A4 paper, in double-spaced typing with at least 4 cm upper lower, and left margin. Typescripts should be submitted in triplicate. Besides the 3 copies of the manuscript, authors are requested to submit the paper on diskette (3 1/2") made in one of the next word processing systems: Word for MS-DOS; Word for MACINTOSH; Word Perfect for DOS indicating the program and version used. Revised versions of the paper, because of referee's recommendations should always be accompanied by a new diskette and 3 printouts of the manuscript.

Short communications should adhere to a similar format. However it should contain no section headings, but text is supposed to contain, in a concise way, every information relevant to the above mentioned headings (Introduction, Materials and Methods, etc.). Short communications should not exceed three pages.

Review papers, updating, and reports on research in progress should be as concise as can be. Such articles should not exceed three pages. Their wording should address a scientifically educated readership that, however, can be unfamiliar with topics involved. Review papers, updating, and reports on research in progress previously requested to

authors by the Editorial Board will be privileged. Book review should have been requested to authors by the Editor. Authors should sustain their contention on the book submitted to their attention. Besides, authors of any book review should submit the following information: Title of the book in its original language, full names of authors or editors of the book, edition number of the book, translator's name if any, publisher's full name, city, volume number if any, number of pages and publishing years. The full name and academic or professional affiliation of the author of any book review should be stated clearly. Book review should not exceed two pages.

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

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

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

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

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

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

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

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

Authors should be aware that any extra charge caused by the printing of illustrations will be levied

for each illustration.

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

-Literature references in the text should be given at the appropriate places by numbers between brackets. For example: "Isoenzymes separation was performed by electrophoresis according to a technique developed by Diestz and Lubrano (4)".

When referring to an article written by more than one author, the last name (surname) of the first author will be followed by "et al." For example: "Castañé et al. (5) have been the first researchers in..."

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

- A paper published in a journal.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

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

publicadas notícias relacionadas com diferentes campos da Toxicologia.

Acta Toxicológica Argentina (em adelante "Acta") publicará contribuições em espanhol, português e inglês. Todas serão avaliadas por dois revisores; a seleção deles será atribuição exclusiva do Comité

Editorial. Este processo determinará que o mencionado Comité opte por eliminar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido para sua consideração. Em todos os casos os autores receberão cópia sem assinatura da opinião dos avaliadores.

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

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

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

- Página 3 em seguida: o Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Bibliografia indicada, Títulos de Ilustrações e Quadros com legendas. A extensão máxima destes aportes não deverá superar 8 (oito) páginas. O texto deverá ser escrito com PC em papel tamanho A4 com espaço duplo, com margens superior, inferior e esquerda de 4 cm. Deverão ser enviados 3 jogos.

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

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

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

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

Os comentários bibliográficos serão contribuições solicitadas pelo Diretor.

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

Será claramente indicado o nome do comentarista,

instituição à qual pertence e endereço completo. O texto não poderá ocupar mais que 2 (duas) páginas. As notas técnicas referir-se-ão exclusivamente a modificações de métodos, determinação dos respectivos erros etc. Sua extensão não ultrapassará 2 (duas) páginas; ao final deverão constar os dados que identifiquem claramente os autores.

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

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

- Em todos os casos dever-se-á consignar no ângulo superior direito de cada folha o sobrenome do autor ou do primeiro autor e o número correlativo que corresponde, inclusive as páginas com quadros.

- No caso de substâncias químicas, se adotará como referencia prioritária as normas da IUPAC.

- Os organismos serão denominados segundo as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico ou sublinhados.

- As ilustrações (fotografias, gráficos) devem ser confeccionadas com materiais de alta qualidade, com técnicas que possibilitem sua reprodução sem tratamentos especiais. E aconselhável que este material tenha as dimensões de Acta; os autores devem ter em comta que, nos caso de ilustrações nas quais seja necessário proceder a sua redução, o tamanho das letras, números e outros elementos devem ter dimensões maiores para que a nitidez não seja afetada depois da impressão.

- Serão enviados um jogo de originais e duas cópias. Cada uma das ilustrações deverá levar no verso, escrito com lápis suave, o número que lhe corresponda, nome do primeiro autor e mediante uma seta será indicada a posição superior. Os títulos irão em folha separada.

- Os custos adicionais que possam produzir-se pela edição do referido material ficarão a cargo do autor.

- Os quadros e suas legendas serão apresentados em forma individual, em folhas separadas, identificadas segundo numeração arábica, segundo a ordem em que apareçam no texto. A localização preferida do quadro no texto será indicada mediante uma seta. Os quadros localizar-se-ão no final de cada manuscrito.

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

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

- As referências bibliográficas serão agrupadas segundo o título "Bibliografia citada"; a lista será

organizada segundo os números correspondentes. O formato das citações é o seguinte:

- Artigo em publicação periódica: o "Malla Reddy, P. and Bashamohideen M. (1989). Fenvalerate and Cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochim. Hydrobio.* 17(1), 101-107."
- Livro: "Dix, H.M. (1981), *Environmental pollution*. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."
- As abreviações do nome das revistas serão as que elas mesmas indiquem no texto.
- Qualquer modificação excepcional das normas estipuladas que os autores solicitem será considerada pelo Diretor.
- As provas de impressão serão enviadas ao autor

indicado como receptor da correspondência.

- As mesmas serão revistas e devolvidas dentro de 48 horas após recebidas.
 - O autor indicado receberá 10 separatas sem despesa. O excedente solicitado sobre essa quantidade será custeado por ele ou demais autores; a quantidade solicitada deverá ser comunicada ao Editor no momento de devolver as provas de impressão.
- Toda a correspondência relativa à *Acta Toxicológica Argentina* deverá ser dirigida ao Comité Editorial, Alsina 1441, Of. 302 - (1088) Buenos Aires, Argentina. Telefax: ++54-11-4381-6919.
- Solicita-se troca com outras publicações tematicamente afins com a *Acta Toxicológica Argentina*.

