

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 15
N° 2
Diciembre 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 Fiscalización

Titulares

María del Carmen Magariños

Adriana Ridolfi

Suplente

Daniel González

Comité Científico

Marta A. Carballo

José A. Castro

Oswaldo H. Curci

Ricardo Duffard

Aldo S. Saracco

Tribunal de Honor

Carlos García

Estela Giménez

María Rosa Llorens

Acta Toxicológica Argentina

Director

Ricardo Duffard *LATOEX, FBIOyF-UNR*

Comité de Redacción

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)

EXPOSICIÓN A ESTIRENO EN CABINAS PREFABRICADAS. ESTUDIO COMPARATIVO 2003 - 2005 <i>STYRENE EXPOSURE IN PRE-BUILT CABINS. COMPARATIVE STUDY 2003 - 2005</i> Cousillas, Adriana; Martinez, Gabriela; Mañay, Nelly	35
ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DE <i>Picrasma crenata</i> (Vell.) Engl. -SIMAROUBACEAE- <i>GENOTOXICITY STUDY ON Picrasma crenata (Vell.) Engl.-SIMAROUBACEAE-</i> Roldán, Roxana M.; Noriega, María F.; Wagner, Marcelo L.; Gurni, Alberto A. y Bassols Graciela B.	39
METABOLITOS DEL EFAVIRENZ COMO PROBABLE CAUSA DE FALSOS-POSITIVOS EN TEST INMUNOLÓGICO PARA BENZODIACEPINAS EN ORINA. <i>FALSE-POSITIVE IMMUNOASSAY RESULTS FOR URINE BENZODIACEPINES PROBABLY CAUSED BY EFAVIRENZ METABOLITES</i> Quiroga, Patricia N.; Mirson, Daniel J.E.; Ridolfi, Adriana S.; Fuentes, Silvia; De Cristóforo, María de los Angeles; Navoni, Julio; Villaamil Lepori, Edda C.	44
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES <i>INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS</i> <i>INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES</i>	51

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

EXPOSICIÓN A ESTIRENO EN CABINAS PREFABRICADAS. ESTUDIO COMPARATIVO 2003 - 2005

Cousillas, Adriana;* Martínez, Gabriela; Mañay, Nelly

Cátedra de Toxicología e Higiene Ambiental, Facultad de Química. General Flores 2124. Uruguay Tel: 00598 2 9241809

* Correspondencia E-mail: azcousil@fq.edu.uy

Resumen: EXPOSICIÓN A ESTIRENO EN CABINAS PREFABRICADAS. ESTUDIO COMPARATIVO 2003 - 2005. Adriana Cousillas; Gabriela Martínez; Nelly Mañay. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (2): 35-38.* Los objetos fabricados con las resinas reforzadas pueden liberar al medio ambiente, vapor de estireno, lo que conlleva a tener una exposición al disolvente. En Uruguay, para el desarrollo de diferentes tareas administrativas, de vigilancia, de comercio, etc. se utilizan unas cabinas que son fabricadas con resinas de poliéster no saturadas.

En un trabajo anterior se comprobó que existía exposición a estireno en este tipo de cabinas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los riesgos higiénicos a los que está expuesto el personal de empresa que desarrolla sus tareas administrativas en cabinas de fibra de vidrio reforzadas de resina.

Se realizaron muestreos ambientales en cabinas ubicadas en diferentes zonas del Montevideo durante el año 2004 y 2005. Los valores de referencia que se utilizaron fueron los de la American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) de 2006.

El trabajo realizado demuestra que no existe exposición del personal a vapores de estireno en sus lugares de trabajo con el consiguiente riesgo descrito para estos productos. Considerando los resultados del año 2003, se concluye que los valores obtenidos ese año fueron puntuales del tipo de cabinas.

Palabras clave: Estireno; Monitoreo de ambiente de trabajo; Cabinas de fibra de vidrio.

Abstract: STYRENE EXPOSURE IN PRE-BUILT CABINS COMPARATIVE STUDY 2003 - 2005. Adriana Cousillas; Gabriela Martínez; Nelly Mañay. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (2): 35-38.* The objects made with reinforced resins can release styrene steam to the indoor environment, which involves worker's exposure to this toxic solvent. In Uruguay, some administrative, commerce, and more tasks are carried out in those fiber glass cabins which are manufactured with those resins.

In a previous study we had high values of styrene in air and his metabolites in urine for people working in this buildings. The aim of this study is the evaluation of the hygienic risks to exposed workers from different companies who perform their administrative tasks in reinforced fiber glass cabins. Environmental samplings were made. The reference values used were those of the American Conference of Industrial Governmental Hygienists of 2005 (ACGIH). The results obtained demonstrates that there was no exposure to styrene released from the cabin. The study in 2003 was a particular cabins problem.

Key words: Styrene; Indoor air monitoring; Fiber glass cabins.

INTRODUCCIÓN

El estireno se conoce también, como vinilbenceno, etenilbenceno, cinameno o feniletileno. Es usado, como diluyente reactivo para resinas de poliéster no saturadas tiene un olor desagradable y es un conocido irritante para los ojos, nariz y garganta.

A altas concentraciones, la exposición a vapor de estireno produce narcosis y la exposición repetida puede inducir efectos citogénicos de linfocitos periféricos en las personas expuestas en ambientes laborales. La actividad cancerígena en el hombre sigue siendo incierta pero se ha reportado este efecto en animales. (1,2)

Estas resinas plásticas, reforzadas con estireno, se emplean para la fabricación de objetos de gran volumen como piscinas, yates, carrocerías de automóviles, cabinas y otras partes de vehículos, contenedores, tubos, láminas y también en pinturas y cementos. (2-4)

La mayoría de estos productos contienen estireno en forma de una cadena larga (poliestireno) como también estireno sin formar cadenas. Bajos niveles de estireno también ocurren naturalmente en una variedad de alimentos tales como frutas, hortalizas, nueces, bebidas y carnes. (4)

El estireno (líquido o vapor), puede penetrar en el

organismo por inhalación o por vía dérmica. En el organismo es oxidado a óxido de estireno y seguidamente hidrolizado a estirenglicol que se transforma en ácido mandélico y luego en ácido fenilglicoxílico. (5). Una pequeña porción puede ser eliminada por vías respiratorias en forma inalterada pero la mayor parte lo hace a través de la orina como ácido mandélico y ácido fenilglicoxílico, con una vida media entre 5 y 10 horas (1)

Los objetos fabricados con las resinas reforzadas pueden liberar al medio ambiente, vapor de estireno (2) lo que conlleva a tener una exposición indirecta al disolvente.

En Uruguay, estas cabinas son ampliamente utilizadas para el desarrollo de diferentes tareas: administrativas, de vigilancia, de comercio, etc.

Existe gran variedad de las mismas, de diferentes procedencias, calidad y tamaño. La gente puede trabajar todo el día dentro de ellas (con diferentes grados de confort) o utilizarlas en forma parcial.

Las sustancias utilizadas en el proceso de fabricación de cabinas son: cera desmoldante, alcohol polivinílico, resina isoftálica, resina viniléster, agente tixotrópico (SiO₂), acelerante A (con cobalto), monómero de estireno.

Los pasos para la fabricación son los siguientes:

- Fase 1: se usa cera desmoldante y alcohol polivinílico
- Fase 2: se aplica gel coat: mezcla de resina isoftálica, resina viniléster, agente tixotrópico, acelerante A y monoestireno
- Fase 3: para finalizar el proceso se utiliza resina de poliéster insaturada, preparada a partir de resina ortoftálica, monoestireno, acelerante A y peróxido de metiletilcetona

Es normal verlas por la ciudad de Montevideo y en otras ciudades del interior del país.

ANTECEDENTES

En el año 2003, a través de un asesoramiento que realizó la Cátedra de Toxicología, se realizó una evaluación de los riesgos higiénicos en el personal de una empresa que desarrollaba sus tareas administrativas en cabinas de fibra de vidrio reforzadas de resina. Los empleados se quejaban del olor y presentaban malestares durante el desarrollo de las tareas administrativas.

El estudio se realizó en 3 centros poblados del interior del Uruguay (6).

Se realizaron mediciones ambientales (estireno en aire) y biológicas (ácido mandélico en orina). En aquel año, 2003, se concluyó que existía exposición del personal a vapores de estireno en sus lugares de trabajo con el consiguiente riesgo des-

critado para estos productos. Los resultados concordaban con la sintomatología que presentaban las personas. Se realizó un detallado informe a la empresa que decidió cerrar las cabinas y desplazó el personal a otras áreas mientras se conseguían locales adecuados para la realización de las tareas administrativas.

OBJETIVO

La Cátedra de Toxicología e Higiene Ambiental inicia en el año 2004, una investigación sobre la posible exposición del personal que utiliza cabinas de fibra de vidrio reforzadas con estireno. El objetivo fue evaluar si los resultados del asesoramiento del 2003, fueron sobre un hecho puntual, o si se trataba de una situación general.

MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto del año 2004 consistió en iniciar una investigación con las empresas que fabrican o ensamblan este tipo de cabinas pero no aceptaron la propuesta. Fue una tarea complicada intentar hacer el relevamiento de las empresas por el temor de los empresarios de que los resultados no fueran aceptables y por consiguiente tener problemas con el personal o sindicales.

Después de un gran esfuerzo con notas y entrevistas, se invitó a participar del estudio a empre-

Tabla 1. Descripción de los lugares y condiciones de muestreo en el año 2004.

Fecha	Empresa	Lugar	Clima/ Temp. dentro de cabina	Tamaño cabina en metros	Flujo L/min	Tiempo min
17/03/04	1	Hipódromo	soleado / 29°C	1x1x2	0,34	188
17/03/04	1	Hipódromo	soleado / 29°C	1x1x2	1,17	188
17/03/04	1	Hipódromo	soleado / 31°C	0,75x0,75x2	0,20	178
17/03/04	1	Hipódromo	soleado / 28°C	1x1x2	0,37	172
17/03/04	1	Hipódromo	soleado / 28°C	1x1x2	0,19	172
24/05/04	2	Puerto	lluvia / 20°C	4x2x2	0,15	164
24/05/04	2	Puerto	lluvia / 20°C	4x2x2	0,35	165
25/05/04	2	Puerto	lluvia / 19°C	4x2x2	0,34	156
26/05/04	2	Puerto	lluvia / 17°C	4x2x2	0,17	140
26/05/04	2	Puerto	lluvia / 18°C	4x2x2	0,17	156
07/05/04	3	Laboratorio	lluvia / 18°C	2x2x2	0,35	36
17/05/04	3	Laboratorio	lluvia / 19°C	2x2x2	0,17	36
07/06/04	4	Fabrica	soleado / 20°C	1x1x2,5	0,17	241
07/06/04	4	Fabrica	soleado / 21°C	1x1x2,5	0,35	237
07/06/04	4	Laboratorio	soleado / 20°C	1x1x2,5	0,35	237
21/05/04	5	Courrier	Sin dato	4x2,5x2	0,17	240



Figura A. Cabina en el puerto de Montevideo (24/05/04).



Figura B. Cabina en courier particular (21/05/04).

Tabla 2. Descripción de los lugares y condiciones de muestreo en el año 2005.

Lugar	Club de Pesca Montevideo	Cabina de la Facultad de Química	Club Ramirez
Fecha	15/09/05	19/09/05	22/09/05
Flujo L/min	0.2	0.2	0.2
Tiempo (min)	378	360	234
T (°C) / Hr (%)	24.0 / 35.4	24.1 / 45.0	26.2 / 31.0



Figura C. Equipo de muestreo en la cabina de la Facultad de Química.

sas de seguridad privadas, que utilizaban este tipo de cabinas para sus empleados. Afortunadamente, en este caso, hubo una buena aceptación y se realizó el trabajo en el mismo año 2004. Aceptaron a participar 5 empresas de vigilancia reconocidas en el país. Se evaluaron 16 cabinas distribuidas en Montevideo y en cada una se tomó una muestra ambiental (Tabla 1).

Las Figuras A y B muestran algunas de las cabinas que se utilizaron para el trabajo.

En el año 2005, se repitió el estudio en otras 3 cabinas de Montevideo ubicadas en 3 barrios diferentes. Se realizó también, un muestreo ambiental en cada una (Tabla 2). En la Figura C se observa

el equipo utilizado en la Facultad de Química durante el muestreo del día 19/09/05.

La toma y análisis de muestras se realizó según el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos, NIOSH (método 1501) (7) Se utilizaron tubos de carbón (150/50 mg) y bombas autónomas, con un flujo conocido. Los tubos se trasladaron al laboratorio, se colocó el carbón en viales, se agregó disulfuro de carbono. Se realizó el análisis para la identificación y cuantificación de estireno por Cromatografía de Gases con detector de llama (FID). El límite de detección del Cromatógrafo de gases utilizado SRI 8610 para el estireno es de 2 ppm.

RESULTADOS

La *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) (8) establece los valores TLV (Threshold Limit Value) que se refieren a concentraciones ambientales, aceptadas para diferentes contaminantes presentes en ambientes laborales. Nuestro país adopta dichos valores a través del Ministerio de Salud Pública del Uruguay. El nivel recomendado por ACGIH (2006) es 20 ppm, lo que corresponde a 85.2 mg/m³.

Todas las muestras tomadas en los años 2004 y

2005 dieron por debajo del límite de detección.

CONCLUSIONES

Los valores de vapores estireno en el ambiente laboral del año 2003 superaron en todos los casos el valor de 100 mg/m³ de aire.

A través de este estudio se concluye que el trabajo del año 2003 fue un hecho puntual, una situación particular denunciada.

Sin embargo, a pesar de no haber detectado la presencia de estireno en los estudios del 2004 y 2005, se recomienda tener en cuenta la posible exposición a estireno frente a problemas de salud para personas que permanezcan en este tipo de construcciones.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. World Health Organization Guidelines (1996), 1:195-204.

2. Lauwerys, R. (1994). Materias plásticas. Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Masson SA, Paris (versión en español). p 451- 453.

3. Vainio, H. (1991). Styrene, Nordic Expert Group for Documentation of Occupational Exposure Limits. *Arbete och Halsa*, (2), p 189-279.

4. Estireno [en línea] Agency of Toxics substances and disease Registry (ATSDR) <http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts53.html> [Consulta: noviembre 2007] 100-42-5

5. Ohtsuji, H. and Ikeda, M. (1971). The metabolism of styrene in the rat and the stimulatory effect of phenobarbital. *Toxicology and Applied Pharmacology* (18) p 321-328.

6. Cousillas, A.; Korbut, S.; Mañay, N. and Rampoldi, O. (2004) Exposición a Estireno en Cabinas Prefabricadas. *Revista de Toxicología en línea (Retel)*, N°5, <<http://sertox.com.ar/retel/n05/003.htm>> [Consulta: noviembre 2007].

7. Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH). <<http://www.cdc.gov/spanish/niosh/ab-sp.html>> [consulta noviembre 2007]

8. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (2006) Threshold Limits Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. TLVs and BEIs, Signature Publications, Cincinnati, Ohio, p 52.

ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DE *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. -SIMAROUBACEAE-

Roldán, Roxana M.; Noriega, María F.; Wagner, Marcelo L.; Gurni, Alberto A. y Bassols Graciela B.*

Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junín 956 Piso 4 (1113) Buenos Aires. República Argentina.

* Correspondencia: Bassols Graciela. Cátedra de Farmacobotánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 Piso 4 (1113) Buenos Aires. República Argentina. TEL: 4964 – 8261. E-mail: gbassols@ffybu.uba.ar

Resumen: ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD DE *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. -SIMAROUBACEAE-. Roxana M. Roldán; María F. Noriega.; Marcelo L. Wagner; Alberto A. Gurni y Graciela B. Bassols. *Acta Toxicol. Argent.* (2007) 15 (2): 39-42. En la medicina popular se utiliza el leño de *Picrasma crenata* en infusión como pediculicida y como tónico amargo no astringente. Los principios activos responsables de la actividad son los quasinoídes. Los objetivos de este trabajo son: determinar la actividad de las infusiones sobre el desarrollo de raíces y la división celular mediante el Test de *Allium cepa*; analizar la correlación de las concentraciones y los parámetros macro y microscópicos e interpretar la posible genotoxicidad de la infusión. Las concentraciones empleadas fueron 2,5 mg%; 5,0 mg%, 10,0 mg%, 20,0 mg% y 40,0 mg%. Se observó una correlación estadísticamente significativa de las concentraciones con las longitudes de las raíces y las anomalías macroscópicas; además, una correlación significativa de los índices mitóticos con las longitudes de las raíces y las anomalías microscópicas. Así, se puede inferir que los extractos en las concentraciones ensayadas podrían presentar actividad genotóxica.

Palabras clave: *Picrasma crenata*; Test de *Allium cepa*; Genotoxicidad.

Abstract: GENOTOXICITY STUDY ON *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.-SIMAROUBACEAE-. Roxana M. Roldán; María F. Noriega.; Marcelo L. Wagner; Alberto A. Gurni y Graciela B. Bassols. *Acta Toxicol. Argent.* (2007) 15 (2): 39-42. Infusions of *Picrasma crenata* woods are used in folk medicine against lice and as a non astringent bitter tonic. The active principles responsible for the activity are the quasinoídes. The objectives of this work are: to establish the activity of the infusions on the development by roots and the cellular division by means of the Test of *Allium cepa*; to analyze the correlation of the concentrations with macro and microscopic parameters and to conclude about the possible genotoxicity of the infusion. The used concentrations were 2.5 mg%; 5,0 mg%, 10,0 mg%, 20,0 mg% and 40,0 mg%. A statistically significant correlation between the concentrations and the roots lengths and macroscopic aberrations and a significant correlation between the mitotic index and the roots lengths and microscopic aberrations have been observed. Thus, it is possible to deduce that the extracts in the tested concentrations could present genotoxic activity.

Key words: *Picrasma crenata*; *Allium cepa* test; Genotoxicity.

Palavras chaves: *Picrasma crenata*; teste da *Allium cepa*; Genotoxicidade.

INTRODUCCIÓN

Picrasma crenata (Vell.) Engl. [= *Aeschrion crenata* Vell., *Picrasma palo amargo* (Speg.) Speg.] - (Simaroubaceae), es un árbol que crece en el este de Brasil y el noroeste de la República Argentina principalmente en la provincia de Misiones. Es conocida en la región con los nombres vulgares de "palo amargo", "cuasia", "paraih", entre otros (1,2).

En la medicina tradicional argentina, el tallo entero se emplea, en forma de infusión, como antiperiódico, antisifilítico y tónico (1). El leño se utiliza como amargo en la composición de bebidas alcohólicas y aperitivos (Foto 1); también se lo usa como insecticida y en la elaboración de tinturas alcohólicas como sustituto de la *Quassia amara* L. y de *Picrasma excelsa* (Swartz) Planchon. para el tratamiento de la pediculosis (3).

Polonsky y Lederer, en 1959, aislaron del leño de palo amargo 2,6-dimetoxibenzoquinona y cuassina (4,5). Posteriormente se han aislado varios alcaloides con estructura 2-carbolina: 1-carbometoxi-2-carbolina; 1-etil-4-metoxi-2-carbolina (crenatina) y 1-etil-4,8-dimetoxi-2-carbolina (crenatidina) (5). Además, se aislaron tres cuasinoídes: 12-norcuasina, paraina e isoparaina (6).

Los cuasinoídes son los compuestos que se

encuentran en mayor cantidad en el leño de *P. crenata*. Son principios amargos y poseen actividades farmacológicas importantes como antiviral,



Foto 1: leño de *Picrasma crenata*

antimalárico, amebicida, antitumoral, antileucémico y citotóxico (4,7). En la actualidad se están estudiando los principios amargos para ser utilizados como insecticidas en cultivos y en alimentos almacenados (8).

Los objetivos del presente trabajo son :

a) Determinar la correlación entre la actividad de las diferentes concentraciones de la infusión, el desarrollo de las raíces y la división celular (mitosis) mediante el test de *Allium cepa* (test de primera aproximación).

b) Analizar la correlación de las diferentes concentraciones de la infusión y los parámetros macro y microscópicos.

c) Interpretar, en base a los resultados obtenidos, la posible actividad genotóxica del extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon muestras comerciales de leño autenticadas, provenientes de la provincia de Misiones, República Argentina.

Se trabajó con infusiones preparadas según Farmacopea Nacional Argentina VI edición (9).

Las concentraciones empleadas para dicho estudio fueron 2,5 mg%; 5,0 mg%; 10,0 mg%; 20,0 mg% y 40,0 mg%

El ensayo genotóxico utilizado fue el Test de *Allium cepa* siguiendo el modelo de Fiskesjö (test de primera aproximación)(10).

Se seleccionaron 50 bulbos de cebollas (*Allium cepa* L. -Alliaceae-), de 5 cm de diámetro promedio adquiridos en el comercio. Se lavaron, se despojaron de las catáfilas externas, sus discos se rasparon y eliminaron las raíces preexistentes, con el fin de dejar expuestos los primordios radicales. Así preparados se colocaron en agua durante 48 horas. Luego se realizó una selección de las cebollas tomando como parámetro el buen desarrollo de sus raíces. Se dividieron en lotes de 5 bulbos cada uno, para las concentraciones a testear y para los controles. Posteriormente se pusieron en contacto con las distintas infusiones a ensayar por el término de tres días. Al tercer día se retiraron 5 raíces de cada bulbo y se realizó el "squash" de cada ápice a fin de analizar los parámetros

microscópicos. Los "squash" se tiñeron con una solución de orceína lactopropiónica. Al cuarto día se cuantificaron las raíces restantes, se midieron sus longitudes y se analizaron los parámetros macroscópicos (tipificación de anomalías). Se utilizó como control negativo agua mineral cuya relación Ca^{2+}/Mg^{2+} fuera de 50-70 mg/l y como control positivo una solución de dicromato de potasio ($Cr_2O_7K_2$) 2.10^{-5} M.

Determinación de la toxicidad aguda

Los parámetros macroscópicos analizados fueron: longitud de las raíces, cuantificación y tipificación de las anomalías apicales tales como ganchos, tumores, necrosis, estrías, coloración y gelatinización (10).

Determinación de la genotoxicidad

Se realizó en base a los parámetros microscópicos observados en el "squash". Se analizaron 1000 células por ápice y se determinaron los siguientes parámetros:

• Índice mitótico = $\frac{\text{número de células en división}}{\text{número de células totales}} \times 1000$ (IM)

• Índice de fases = $\frac{\text{número de células en cada fase}}{\text{número total de células en división}} \times 1000$ (IF)

- Cuantificación de anomalías de cada fase y totales.
- Tipificación de anomalías: cromosomas arrestados (Foto 2), pegajosos, c-mitosis (Foto 3), "vagrant" (Foto 4), puentes cromosómicos, entre otros.
- Análisis estadístico: para el análisis estadístico se empleó el método de regresión lineal y correlación.

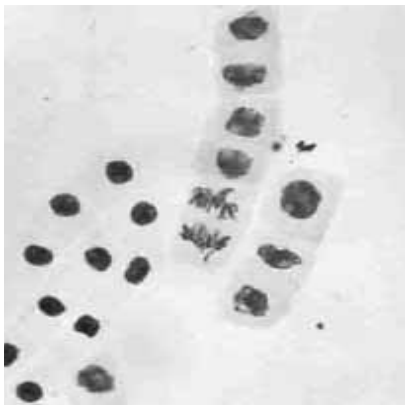


Foto 2: Cromosomas arrestados



Foto 3: Cromosomas en c-mitosis

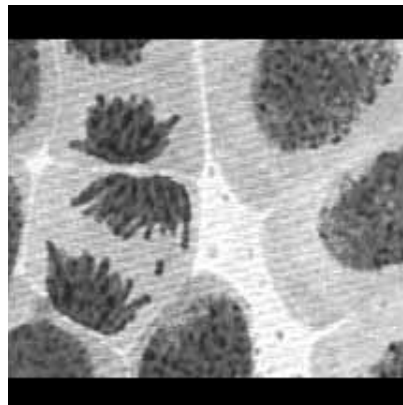


Foto 4: Cromosomas en "vagrant"

RESULTADOS**a) Determinación de toxicidad aguda:**

Sobre el total de raíces que se desarrollaron se calculó el porcentaje de anomalías macroscópicas (Tabla 1):

Tabla 1. Anomalías macroscópicas observadas.

		Concentraciones				
		2,5 mg %	5 mg%	10 mg%	20 mg%	40 mg%
A n o m a l í a s	Tumores	2,5 %	6,8 %	6,4 %	25 %	23,3 %
	Ganchos	3,8 %	5,1 %	7,1 %	5,8 %	6,7 %
	Puntas necrosadas	8,8 %	18,2 %	18,6 %	3,8 %	6,7 %

Concentración al 2,5 mg%: tumores (2,5 %), ganchos (3,8 %) y puntas necrosadas (8,8 %).
 Concentración al 5,0 mg%: tumores (6,8 %), ganchos (5,1 %) y puntas necrosadas (18,2 %).
 Concentración al 10,0 mg%: tumores (6,4 %), ganchos (7,1 %) y puntas necrosadas (18,6 %).
 Concentración al 20,0 mg%: tumores (25,0%), ganchos (5,8%) y puntas necrosadas (3,8%).
 Concentración al 40,0 mg%: tumores (23,3%), ganchos (6,7 %) y puntas necrosadas (6,7 %).
 Además, se midieron las raíces cuyos promedios y rangos se muestran en la Tabla 2.

b) Determinación de genotoxicidad:

Las anomalías microscópicas observadas para cada concentración (Tabla 3) fueron:

a) 2,5 mg%: cromosomas pega-josos y/o rezagados, vagrant, anafases arrestadas, con efecto c-mitosis.

b) 5,0 mg%: cromosomas pega-josos y/o rezagados, vagrant, anafases arrestadas, con efecto c-mitosis y puentes.

c) 10,0 mg%: cromosomas pegajosos y/o rezagados, vagrant, anafases arrestadas, con efecto c-mitosis.

d) 20,0 mg%: anafases arrestadas, con efecto c-mitótico.

e) 40,0 mg%: no se observaron anomalías microscópicas.

Sobre la base del conteo de células en cada fase y totales se calcularon los distintos índices mitóticos y de fases cuyos resultados aparecen en la Tabla 2.

De acuerdo con los resultados anteriores se determinaron las siguientes correlaciones:

a) 92 % entre las longitudes de las raíces y las concentraciones ($0,02 < p < 0,05$)

b) 91 % entre las anomalías macroscópicas y las concentraciones ($0,02 < p < 0,05$)

c) 93 % entre los índices mitóticos y las longitudes de las raíces ($0,02 < p < 0,05$)

d) 91 % entre los índices mitóticos y las anomalías microscópicas ($0,02 < p < 0,05$)

Tabla 2. Índices mitóticos y de cada fase, longitudes de las raíces obtenidas y relación porcentual de las anomalías macroscópicas observadas en cada concentración.

	Control	Concentración 2,5 mg %	Concentración 5 mg %	Concentración 10mg%	Concentración 20 mg %	Concentración 40 mg %
Índice Mitótico	3,4 %	1,25 %	1,37 %	1,20 %	1,6 %	0,00 %
Longitud de raíces	27 mm (8mm – 50mm)	17,9 mm (10mm – 26mm)	16,2 mm (6mm – 35mm)	11,9 mm (5mm – 31mm)	13,7 mm (6mm – 22mm)	12,9 mm (8mm – 23mm)
Anomalías macroscópicas	9,33 %	15,17 %	30,11 %	32,14 %	34,6 %	36,7 %
Índice de profase	56,54 %	55,27 %	60,36 %	59,20 %	69,6 %	0,00 %
Índice de metafase	18,85 %	18,44 %	14,02 %	12,27 %	4,3 %	0,00 %
Índice de anafase	20,77 %	22,54 %	19,51 %	20,60 %	21,7 %	0,00 %
Índice de telofase	3,65 %	2,46 %	6,10 %	7,94 %	4,3 %	0,00 %

Tabla 3. Anomalías microscópicas observadas.

	Concentración				
	2,5 mg%	5 mg%	10 mg%	20 mg%	40 mg%
Cr. pegajosos	+	++	++	-	-
Cr. vagrant	+	+	++	-	-
Puentes cromosómicos	-	+	+	-	-
Cr. en anafase arrestados	+	+	++	+	-
Cr. con efecto de c-mitosis	+	+	+	+	-

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los valores obtenidos muestran una correlación de las concentraciones analizadas con las longitudes de las raíces y las anomalías macroscópicas; así como de los índices mitóticos con las longitudes de las raíces y las anomalías microscópicas. Por lo tanto, se puede establecer que existe una relación directa entre las concentraciones estudiadas y las anomalías macro y microscópicas.

Se observó que a altas concentraciones se produce el arresto de la división mitótica. Esto demuestra actividad genotóxica de este material en el ensayo. El fenómeno genotóxico también se asocia a la presencia de cromosomas en c-mitosis y pegajosos. De acuerdo con esto se puede inferir que las concentraciones empleadas por la población serían seguras debido a que las anomalías se presentan a concentraciones mas altas que las utilizadas tradicionalmente.

Este test de *Allium cepa* es de carácter preliminar, orientativo y constituye el punto de partida para la realización de análisis mas específicos y sensibles (cultivos de linfocitos para la evaluación de biomarcadores como test del cometa, intercambio de cromátides hermanas, cinética de proliferación celular, etc.) para poder evaluar un posible riesgo genotóxico humano, ya que estos ensayos son *in vitro* y no permiten una exacta correlación con lo que ocurre *in vivo* debido a las modificaciones que ocurren en el organismo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Toursarkissian, M. (1980). Plantas Medicinales de la Argentina. Sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Editorial Sur, Buenos Aires.

2. Ragonese, A.E. y Milano, V.A. (1984). Vegetales y sustancias tóxicas de la flora argentina. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería,

2da. Edición, Tomo II, Fascículo 8-2. Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires, 190.

3. Márquez, A., Borri, K., Dobrecky, J., Gurni, A.A. and Wagner, M.L. (1999). New aspects in quality control of "palo amargo" (*Aeschrium crenata* Vell. -Simaroubaceae-). Acta Hort. 503, 111-115.

4. Polonsky, J., Bhatnagar, S. and Moretti, C. (1984). 15-deacetylsergeolide, a potent antileukemic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. Journal of Natural Products. 47 (6), 994-996.

5. Sánchez, E. and Comin, J. (1971). Two new 2-carbolide alkaloids from *Aeschchrion crenata*. Phytochemistry, 10 (9), 2155-2159.

6. Vitagliano, J.C. and Comin, J. (1972). Quassinoids from *Aeschchrion crenata*. Phytochemistry 11 (2), 807-810.

7. Okano, M., Fukumiya, N., Aratani, T., Juichi, M. and Lee, K. (1974). Antitumor agents, 74. Bruceanol-A and -B, two new antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica* Journal of Natural Products, 48 (6), 972-975.

8. Stoll, G. (1989). Protección natural de cultivos en las zonas tropicales. Editorial Científica Josef Margraf, Berlin. 184 pp.

9. Farmacopea Nacional Argentina VI edición. 1978.

10. Fiskesjö, G. (1993). *Allium* test I: a 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal, 8, 461-470.

www.bago.com



Cuidados Intensivos

En Laboratorios Bagó trabajamos intensamente en la investigación y desarrollo de medicamentos, aportando máxima calidad y efectividad terapéutica para la Argentina y el mundo.

 **Bagó**

É T I C A A L S E R V I C I O D E L A S A L U D

METABOLITOS DEL EFAVIRENZ COMO PROBABLE CAUSA DE FALSOS-POSITIVOS EN TEST INMUNOLÓGICO PARA BENZODIACEPINAS EN ORINA.

Quiroga, Patricia N.; Mirson, Daniel J.E.; Ridolfi, Adriana S.; Fuentes, Silvia; De Cristóforo, María de los Angeles; Navoni, Julio; Villaamil Lepori, Edda C.*

Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junin 956- 7^{mo} piso (1113) Buenos Aires. Argentina. Te/Fax: 54-11-4964-8283/8284
*Correspondencia E-mail: evillaam@ffyba.uba.ar

Resumen: METABOLITOS DEL EFAVIRENZ COMO PROBABLE CAUSA DE FALSOS-POSITIVOS EN TEST INMUNOLÓGICO PARA BENZODIACEPINAS EN ORINA. Patricia N. Quiroga; Daniel J.E. Mirson; Adriana S. Ridolfi; Silvia Fuentes; María de los Angeles De Cristóforo; Julio Navoni; Edda C. Villaamil Lepori. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (2): 44-50.* En el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) una de las drogas antirretrovirales usadas es el efavirenz (EFV). Existe una asociación entre el consumo de drogas de abuso y la probabilidad de adquirir el SIDA, razón por la cual se solicita su investigación en orina.

Como método de screening para detectar el consumo de estas drogas se utilizan habitualmente los ensayos inmunológicos. Una característica especial de estos métodos son las reacciones cruzadas que pueden presentarse con sustancias estructuralmente relacionadas dando origen a resultados falsos positivos.

Al analizar 18 muestras de orina de pacientes con SIDA, se observó un 78% de resultados falsos positivos para benzodiazepinas (BZD) cuando fueron analizadas mediante el ensayo inmunológico Triage[®] (Ascend Multi Immune Assay). El estudio confirmatorio por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) reveló la ausencia de BZD en todos los casos y el 100% de los resultados falsos positivos observados correspondieron a las muestras de los pacientes tratados con EFV.

Con el propósito de dilucidar el origen de esta reacción cruzada fueron aislados el EFV y sus metabolitos de las muestras de orina, mediante extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC), e identificados por cromatografía gaseosa- espectrometría de masa (GC-MS y GC-MS/MS/MS).

Los resultados obtenidos en este estudio indicarían que los metabolitos del EFV (8-OH-EFV y/o 7-OH-EFV) y no el EFV podrían ser los responsables de la reacción cruzada observada en el ensayo inmunológico.

Palabras claves: Efavirenz; Falsos positivos; Benzodiazepinas; Triage[®]; SIDA.

Abstract: FALSE-POSITIVE IMMUNOASSAY RESULTS FOR URINE BENZODIAZEPINES PROBABLY CAUSED BY EFAVIRENZ METABOLITES. Patricia N. Quiroga; Daniel J.E. Mirson; Adriana S. Ridolfi; Silvia Fuentes; María de los Angeles De Cristóforo; Julio Navoni; Edda C. Villaamil Lepori. *Acta Toxicol. Argent. (2007) 15 (2): 44-50.* Efavirenz (EFV) is an antiretroviral drug used in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) treatment. Immunoassay techniques have been widely used for abuse drug screening test. The presence of structurally related substances in urine samples can interfere by cross reactions causing false positive results. High percentage of false positive results (78%) for benzodiazepines (BDZ) had been established for 18 urine samples assayed by immunoassay test Triage[®] (Ascend Multi Immune Assay). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) evaluation was negative for BDZ for all cases. One hundred percent (100%) of the positive results came from patients treated with EFV.

With the aim to determine the cause of this cross- reaction, EFV and its metabolites were isolated by solid phase extraction (SPE) and high performance thin-layer chromatography (HPTLC) and then, identified by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS and GC-MS/MS/MS). GC-MS/MS/MS analysis showed that EFV metabolites (8-OH-EFV and/or 7-OH-EFV) could probably be responsible for the cross reaction observed in the immunologic assays.

Key Words: Efavirenz; False positive; Benzodiazepine; Triage[®]; AIDS.

INTRODUCCIÓN

La relación entre el abuso de drogas y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) constituye un complejo problema sanitario en el mundo. Uno de los factores más importantes en la propagación de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causante del SIDA, es el cambio del comportamiento asociado al consumo de drogas de abuso (1-7).

El tratamiento de pacientes con SIDA consiste en terapias antirretrovirales que tienen por objeto reducir la carga viral tanto como sea posible (8,9). Entre las distintas clases de antirretrovirales se encuentra el Efavirenz (EFV), un potente inhibidor no nucleosídico de la HIV-1 transcriptasa reversa

(10-12). Este compuesto es metabolizado por el organismo y excretado en la orina en sus formas libres y conjugadas. El glucurónido del 8-hidroxiefavirenz (8-OH-EFV) es el principal metabolito excretado, siguiéndole en importancia los glucurónidos del 7-hidroxiefavirenz (7-OH-EFV) y del EFV (13).

Dado que el abuso de drogas facilita la propagación de la infección por HIV, aumenta el riesgo de contraer o transmitir otras enfermedades y complica la aceptación del tratamiento por parte de los pacientes, la prevención integral del VIH/ SIDA contempla tratamientos para el abuso de drogas, que con frecuencia requieren de la investigación de estas drogas en orina (14).

Las pruebas de detección más utilizadas como método de screening de estas drogas, son los ensayos inmunológicos (15). Son procedimientos sensibles, simples, con tiempos cortos de procesamiento, aplicables sobre diferentes matrices y de especificidad aceptable (16-21), aún cuando tienen la desventaja de presentar reacciones cruzadas con sustancias que pueden estar estructuralmente relacionadas y que no pertenecen al grupo de interés (22-25). Por este motivo es necesario y recomendable confirmar los resultados positivos obtenidos por los métodos de screening por cromatografía gaseosa- espectrometría de masa (GC-MS).

En el trabajo cotidiano en el Centro de Asesoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA), se observó un alto porcentaje de resultados positivos para benzodiazepinas al analizar muestras de orina de pacientes con SIDA tratados con antirretrovirales. Esta observación se obtuvo cuando fue utilizado el método inmunológico Triage® (Ascendent Multi Immunoassay test) como método de screening capaz de detectar cocaína, anfetaminas, benzodiazepinas, barbitúricos, tetrahidrocannabinol (THC), opiáceos y fenciclidina.

La historia clínica de todos los pacientes estudiados reveló que 14 eran tratados con EFV, 4 con Nevirapina (NVP) y ninguno tenía indicado benzodiazepinas (BZD).

Del total de muestras de orina analizadas, 14 arrojaron resultados positivos para BZD correspondiendo al 100% del grupo tratado con EFV. Este hallazgo, y los antecedentes existentes en la bibliografía sobre la interferencia del EFV en la investigación del tetrahidrocannabinol (THC) y del estradiol por test inmunológicos (26-28), permitieron plantear la hipótesis sobre una posible interacción del EFV, y/o sus metabolitos, con el anticuerpo usado en este ensayo para las BZD, lo que podría explicar la causa de la reacción cruzada observada.

El presente trabajo está dirigido a dilucidar si la presencia de EFV y /o sus metabolitos en orina son capaces de dar falsos positivos para BZD cuando son investigadas por Triage®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y estándares

Metanol, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, ácido acético glacial, n-hexano, acetato de etilo, cloroformo y acetona fueron todos de calidad puro para análisis y provistos por Merck Química Argentina (Buenos Aires, Argentina). El kit inmunológico Triage® para la detección simultánea de siete grupos de drogas en orina (cocaína, anfetaminas, benzodiazepinas, barbitúricos, THC, opiáceos y fenciclidina) fue provisto por Biosite® Diagnostics (San Diego, CA). Las placas de HPTLC, Silica gel 60 F₂₅₄ 10 x 10 cm fueron provistas por Merck Química Argentina (Buenos Aires, Argentina). La β -glucuronidasa de *Escherichia coli* fue provista por Roche Diagnostics

Corporation (Buenos Aires, Argentina). Las columnas de fase reversa e intercambio iónico para extracción en fase sólida (SPE) fueron Clean Screen® (DAU 303, 300 mg/ 3ml, Worldwide Monitoring® USA). El agente derivatizante N-Methyl-N-TMS-Trifluoroacetamide (MSTFA) fue provisto por Pierce (USA). La solución estándar de Efavirenz (0,3 mg/ml en metanol) se preparó a partir de una cápsula comercial de Stocrin® (Bristol - Myers Squibb Co., Princeton, NJ).

Preparación de las muestras

Todas las muestras de orina (n=18) correspondieron a pacientes tratados con drogas antirretrovirales que concurren al CENATOXA por solicitarse la investigación de drogas de abuso.

Extracción en fase sólida (SPE)

Extracción de benzodiazepinas: la extracción de las muestras con resultados positivos por screening inmunológico se realizó usando el protocolo para benzodiazepinas en orina del manual de aplicaciones SPE (United Chemical Technologies Inc.) (29), con la siguiente modificación en el paso de hidrólisis: 10ml de orina fueron ajustados a pH=6 con buffer fosfato 100 mM y se hidrolizaron con 50 μ l de β -glucuronidasa a 48°C durante 1 hora. Los extractos secos obtenidos mediante el protocolo anteriormente indicado, fueron derivatizados con 70 μ l de MSTFA a 70°C durante 20 minutos para su posterior investigación por GC-MS. Se investigaron solamente las benzodiazepinas comercializadas en la Argentina (Tabla 1) (30).

Tabla 1. Benzodiazepinas que se comercializan en Argentina

Benzodiazepinas	Número de productos farmacéuticos
Alprazolam	16
Bromazepam	22
Clordiazepóxido	2
Clobazam	1
Clonazepam	7
Clorazepato	5
Diazepam	19
Estazolam	1
Flunitrazepam	4
Lorazepam	9
Oxazepam	2
Midazolam	5

Extracción del Efavirenz y sus metabolitos: la extracción se realizó a partir de orina blanco cargada con EFV así como de las muestras de orina con resultados positivos para BZD por el screening inmunológico, aplicando el protocolo para drogas terapéuticas y de abuso en orina del manual de aplicaciones SPE (United Chemical

Technologies Inc.) (31), con la modificación antes señalada.

Cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC)

Los metabolitos del EFV fueron aislados por cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC) a partir de los extractos ácido y neutro obtenidos por SPE. Los extractos secos se reconstituyeron en 100 µl de metanol y se sembraron en banda en las placas de HPTLC. El sistema de solventes utilizado como fase móvil fue cloroformo-acetona (90:10). Las bandas fueron visualizadas con luz ultravioleta de onda corta (UV 254 nm), aisladas y los componentes extraídos con metanol.

La identificación de los compuestos presentes en las diferentes fracciones obtenidas se realizó por GC-MS.

Screening inmunológico Triage®

Este ensayo se realizó de acuerdo al protocolo provisto por los fabricantes, en las muestras de orina de los pacientes, en la orina blanco cargada con EFV y en la orina blanco cargada con alicuotas de las fracciones separadas por HPTLC.

Cromatografía gaseosa espectrometría de masa (GC-MS)

GC-MS para BZDs y EFV

Se utilizó un espectrómetro de masa Hewlett Packard cuadrupolar (QMS) (HP, Palo Alto, CA)

modelo 5972A equipado con un cromatógrafo gaseoso 5890 (GC) y una columna capilar HP-5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, J&W Scientific, Folsom, CA).

El programa de temperatura para EFV fue: 90-240°C a 15°C/min; 240°C (4 min); 240-300°C a 30°C/min; 300°C (7 min). Para las BZD el programa de temperatura fue: 60-300°C a 10°C/min; 300°C (5 min). En ambos casos el inyector fue utilizado en modo split, relación de split, 1:10 y el volumen de inyección fue 2µl. La temperatura del inyector fue 265°C; la temperatura de la interfase fue 290°C; el gas carrier fue helio (0,7 ml/min), y se trabajó en modo scan, *m/z* 50 a 550.

GC-MS/MS/MS para EFV y sus metabolitos

Se utilizó un espectrómetro de masa Finnigan Polaris con trampa de iones (ITMS) acoplado a un cromatógrafo gaseoso Trace GC Thermoquest (San José, CA), con capacidad MS-MS. Para el análisis por ITMS se utilizó una columna capilar HP-1MS (metil-siloxano, 25 m x 0,2 mm x 0,33 µm, J&W Scientific, Folsom, CA). El programa de temperatura fue el mismo que se indicó en el párrafo anterior para el EFV por GC-MS. Como gas carrier se empleó helio (1,5 ml/min). La temperatura del inyector fue 265°C y la de la línea de transferencia, 250 °C. El inyector fue utilizado en modo split, relación de split, 1:10 y el volumen de inyección fue 2µl.

El EFV se investigó por GC-MS/MS/MS seleccio-

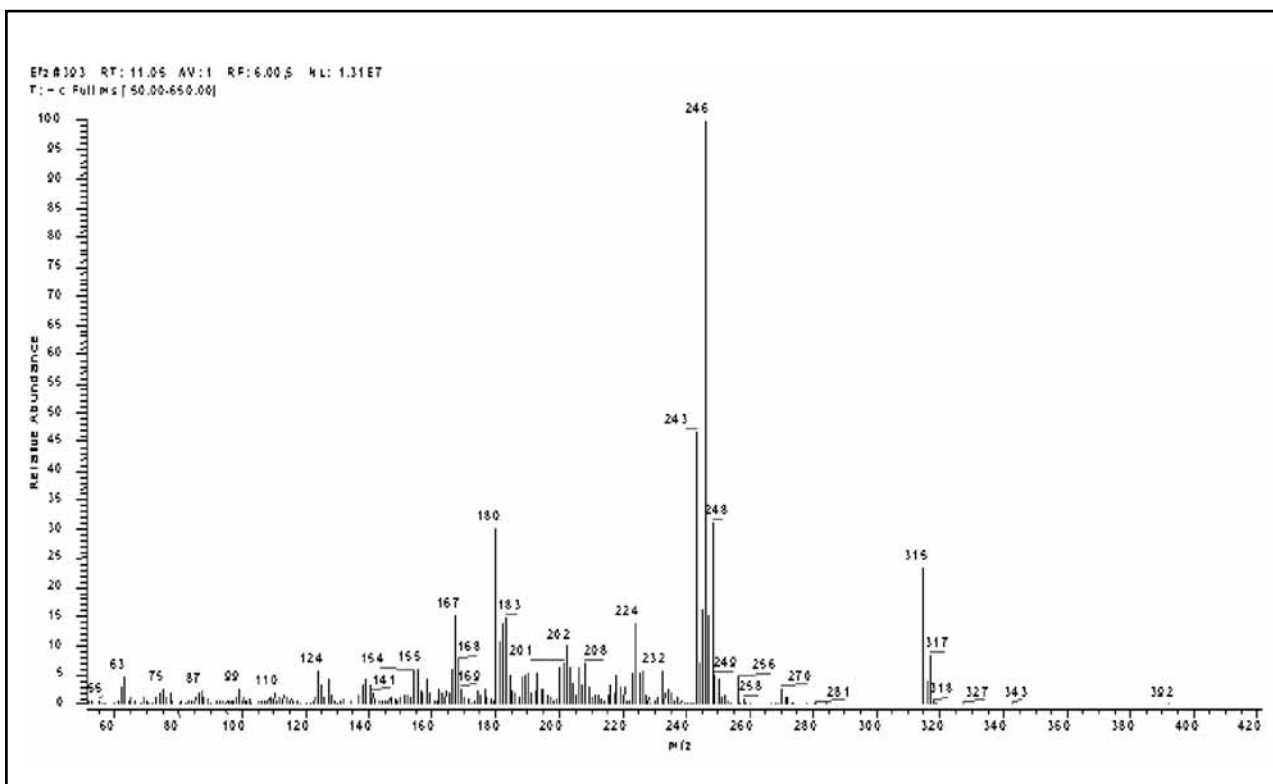


Figura 1. Espectro de masa de EFV por GC-MS

nando el ión molecular m/z 315 el cual fue aislado utilizando un voltaje de excitación de 1,0 V y la energía máxima de excitación de $q=0,30$. Posteriormente se aisló el ión m/z 246 utilizando un voltaje de excitación de 1,0 V y energía máxima de excitación $q=0,225$ y finalmente se realizó el análisis en modo scan de m/z 61 a m/z 250.

Para este procedimiento se tuvo en cuenta el espectro de masas del EFV (ión molecular m/z 315, ión base m/z 246 producido por pérdida del fragmento CF_3) (Figura 1).

El programa Isoform Ver 1.02 de la librería NIST (por sus siglas en inglés National Institute of Standards and Technology) fue utilizado para la identificación de los metabolitos del EFV (7-OH-EFV y 8-OH-EFV). El ión molecular y el patrón isotópico fueron calculados en base a la fórmula empírica. Teniendo en cuenta el patrón de fragmentación del EFV y sus similitudes estructurales (los metabolitos sólo difieren en la posición de un hidroxilo) se hallaron dos moléculas con el mismo ión molecular (m/z 314+17=331) e igual ión base m/z 262 (331-69).

Los metabolitos 7-OH-EFV y 8-OH-EFV fueron analizados aplicando el siguiente método por GC-MS/MS/MS: el ión molecular m/z 331 se aisló usando un voltaje de excitación de 1,0 V y la energía de excitación máxima fue de $q=0,30$. Se aisló el ión m/z 262 usando un voltaje de 1,0 V y la Energía Máxima de Excitación fue $q=0,225$. Se realizó análisis en modo scan desde m/z 65 a 266.

Tabla 2. Resultados por inmunanálisis y por GC-MS para benzodiazepinas en orina de pacientes tratados con Efavirenz (EFV) y Nevirapina (NVP).

Paciente	Tratamiento	Inmunonálisis para BZD	GC-MS para BDZ
1	EFV	+	-
2	EFV	+	-
3	EFV	+	-
4	EFV	+	-
5	EFV	+	-
6	EFV	+	-
7	EFV	+	-
8	EFV	+	-
9	EFV	+	-
10	EFV	+	-
11	EFV	+	-
12	EFV	+	-
13	EFV	+	-
14	EFV	+	-
15	NVP	-	-
16	NVP	-	-
17	NVP	-	-
18	NVP	-	-

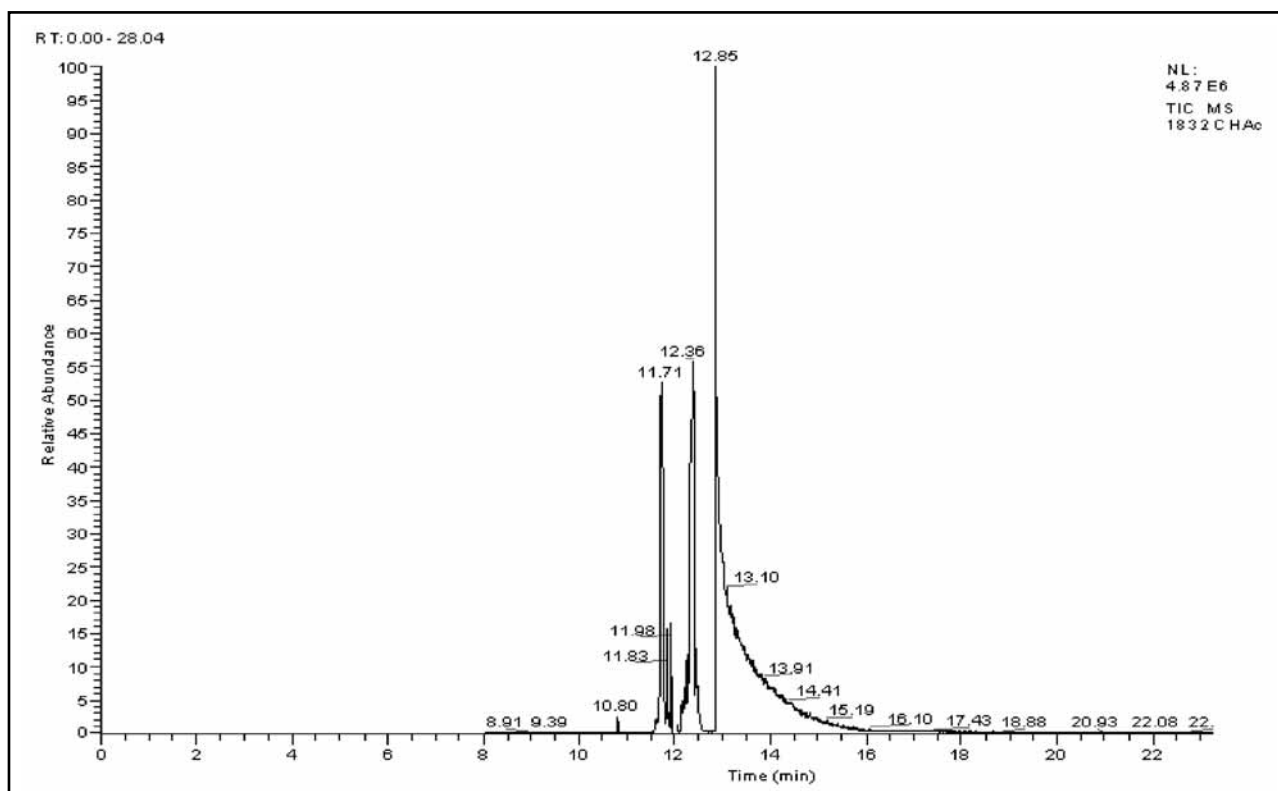


Figura 2. Cromatograma de la fracción obtenida por HPTLC de $R_f=0,61$ (Metabolitos del EFV con $R_t = 11,83$ y $11,98$ minutos)

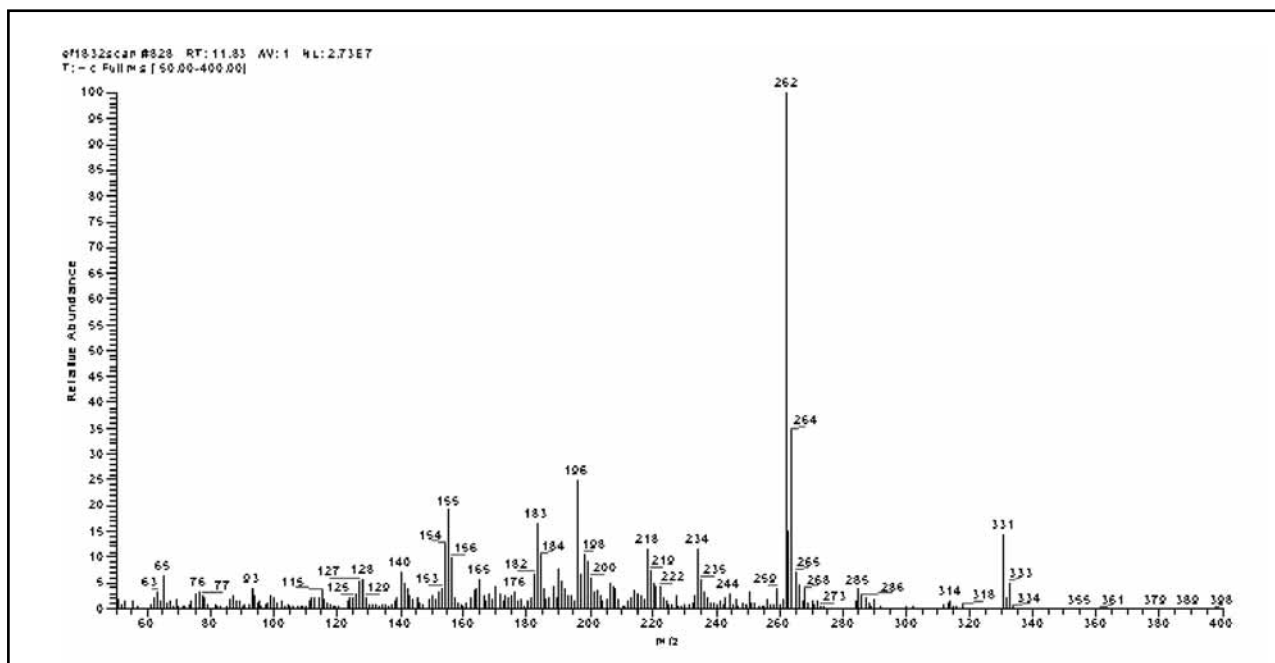


Figura 3. Espectro de masa por GC-MS/MS/MS de las sustancias con Rt = 11,83 y 11,98 minutos que corresponderían a los metabolitos 7 y 8 OH-EFV

RESULTADOS

El 78% de las orinas analizadas por Triage® arrojaron resultados positivos para BZD. Por GC-MS no se confirmó la presencia de BZD en ninguna de estas muestras, correspondiendo el 100% de éstas a orinas de pacientes tratados con EFV (Tabla 2).

Por HPTLC se aislaron 2 fracciones de Rf 0,31 y 0,61. El análisis por GC/MS de ambas fracciones permitió identificar en la banda de Rf 0,61 la presencia de dos sustancias con peso molecular igual a cada uno de los metabolitos 7-OH y 8-OH-EFV. Como estos metabolitos difieren sólo en la posición de un hidroxilo, era esperable que la separación por HPTLC no fuera posible. Por GC-MS se caracterizaron en dicha fracción dos sustancias con tiempos de retención de 11,83 y 11,98 minutos (Figura 2). Por GC-MS/MS/MS se estimó con alta probabilidad la presencia de estos metabolitos del EFV, de ión molecular (m/z 314+17=331) e ión base m/z 262 (m/z 331-69) (Figura 3).

El análisis inmunológico de la orina blanco adicionada con la fracción obtenida por HPTLC de Rf 0,61 dio positivo para BZD, mientras que la orina blanco a la que se le agregó EFV resultó negativa para este grupo de sustancias.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que los metabolitos de EFV, 8-OH-EFV y/o 7-OH-EFV serían los responsables de la reacción cruzada observada en el ensayo inmunológico Triage® para benzodiazepinas. Este hallazgo difiere con la caracterización de la interferencia produ-

cida por EFV en diferentes ensayos inmunológicos para el tetrahidrocannabinol realizada por Steven Rossi et al. (26), la cual postula solo al 8-OH EFV glucurónico como responsable de la reacción cruzada.

Si bien para lograr una completa identificación de esta reacción cruzada sería necesario realizar estudios con testigos de estos metabolitos libres y conjugados, este trabajo tiene valor por ser la primera constatación de esta interferencia en un método de screening comúnmente utilizado para investigar drogas de abuso que incluye a las BZD, un grupo de fármacos ampliamente utilizados en nuestro medio.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. National Institute on Drug Abuse InfoFacts. El abuso de drogas y su conexión con el VIH/SIDA y otras enfermedades infecciosas [en línea]. National Institute on Drug Abuse (NIDA). Actualizado en mayo de 2007. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. <<http://www.nida.nih.gov/Infofacts/Elabuso-sp.html>> [Consulta: agosto de 2007].
2. Centers for Disease Control and Prevention Fact sheets. Methamphetamine use and risk for HIV/AIDS [en línea]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Actualizada al 3 de mayo de 2007. Department of Health and Human Services. <<http://www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/meth.htm>> [Consulta: julio 2007].
3. Leigh, B.C. and Stall, R. (1993). Substance use and risky sexual behavior for exposure to HIV:

Issues in methodology, interpretation and prevention. *American Psychologist*, 48 (10): 1035-1045.

4. ElSohly, M.A. and Salamone, S.J. (1999). Prevalence of drugs used in cases of alleged sexual assault. *J. Anal. Toxicol.* 23 (3): 141- 146.

5. Romanelli, F. and Smith Kelly M. (2003). Use of club drugs by HIV-seropositive and HIV – seronegative gay and bisexual men. *Topics in HIV Medicine*, vol. 11 (1): 25- 32.

6. Francis, H. (2003). Substance abuse and HIV infection. *Topics in HIV Medicine*, 11 (1): 20-24.

7. Piot, P. Veinte años después [en línea]. Prevención Educación Drogas (Peddro), SIDA y abuso de drogas: bloquear la epidemia. Diciembre de 2001, <<http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001271/127135s.pdf>> [Consulta: julio 2007].

8. Descripciones de Medicamentos y Tratamientos [en línea]. AIDS Education Global Information System (AEGIS), Fact Sheets, The Network. Diciembre 2006. <<http://www.aegis.com/factshts/network/lared/glossmed.pdf>> [Consulta: marzo 2007].

9. Piscitelli, S. C. The antiretrovirals pharmacology: issues and management. [en línea] Bulletin of experimental treatments for AIDS. 1999 year-end special edition. <<http://www.sfaf.org/treatment/beta/b42/b42pharmacology.html>> [Consulta: marzo 2007].

10. Efavirenz InfoSida [en línea]. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Actualizado el 5 de octubre de 2007. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. <http://aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailSP.aspx?int_id=269> [Consulta: octubre 2007].

11. Staszewski, S., Morales Ramirez, J., Tashima, K.T., Rachlis, A., Skiest, D., Stanford, J., Stryker, R., Jonson, P., Cabriola, D.F., Farina, D., Manion, D.J. and Ruiz, N.A. (1999). Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. *N Engl J Med*, 341 (25): 1865- 1873.

12. Cocuzza, A.J., Chidester, D.R., Cordova, B.C., Klave, R.M., Jeffrey, S., Diamond, S, Weigelt, C.A., Ko, S.S., Bacheler, L.T., Ericsson-Viitanen S.K. and Rodgers, J.D. (2001). 4,1 – Benzoxazepinone analogues of efavirenz (SustivaTM) as HIV – 1 reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 1389- 1392.

13. Mutlib, A.E., Chen, H., Nemeth, G.A., Markwalder, J.A., Seitz, S.P., Gan, L.S. and Christ,

D.D. (1999). Identification and characterization of efavirenz metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry and high field NMR: species differences in the metabolism of efavirenz. *Drug Metab. Dispos*, 27 (11): 1319-1333.

14. Dueñas-Laíta, A., Pinacho-Peláez, F., Freijanes, N., Bachiller, P. and Martínez-Barrero, M. (1998). Drugs consumption in AIDS patients under hospital care. *Toxicol. Lett.* 95 (Suppl 1): 121.

15. Wu, A.H.B. Testing urine for drugs of abuse. An overview of testing methods demonstrates opportunities for assay manufacturers in on-site workplace testing [en línea]. IVD Technology. July 2002. <<http://www.devicelink.com/ivdt/archivo/02/07/003.html>> [Consulta: mayo 2007].

16. Moore, K.A., Werner, Ch., Zannelli R.M. Levine, B. and Smith, M.L. (1999). Screening postmortem blood and tissues for nine cases of drugs of abuse using automated microplate immunoassay. *Forensic Sci. Int.* 106: 93-102.

17. Klette, K.L., Wiegand, R.F., Horn, C.K., Stout, P.R. and Magluilo, J. (2005). Urine benzodiazepine screening using Roche Online[®] Kims Immunoassay with ,- glucuronidase hydrolysis and confirmation by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 29 (3): 193- 200.

18. Lin, D.L., Yin, R.M., Chen, Ch.H., Chen, Y.L. and Liu, R.H. (2005). Performance characteristics of 7-aminoflunitrazepam specific enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Anal. Toxicol.* 29 (7): 718- 723.

19. Moore, Ch., Ross, W., Coulter, C. Adams, L., Rana, S., Vincent, M. and Soares, J. (2006). Detection of the marijuana metabolite 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9 carboxylic acid in oral fluid specimens and its contribution to positive results in screening assays. *J. Anal. Toxicol.* 30 (7): 413- 418.

20. Pujol, M.L., Cirimele, V., Tritsch, P.J., Villain, M. and Kintz, P. (2007). Evaluation of the IDS One-StepTM ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. *Forensic Sci. Int.* 170: 189-192.

21. Apollonio, L.G., Whittall, I.R., Pianca, D.J., Kyd, J.M. and Maher, W.A. (2007). Matrix effect and cross-reactivity of select amphetamine- type substances, designer analogues, and putrefactive amines using the Bio-Quant Direct ELISA Presumptive Assay for amphetamine and methamphetamine. *J. Anal. Toxicol.* 31 (4): 208- 213.

22. El Sholy, M.A. and Jones, A.B. (1995). Drug testing in the workplace: could a positive test for one of the mandated drugs be for reasons other than illicit use of the drug? *J. Anal. Toxicol.* 19 (6): 450- 458.

- 23.** Marson, C., Schneider, S., Meys, F. and Wennig, R. (2000). Structural elucidation of an uncommon phenylethylamine analogue in urine responsible for discordant amphetamine immunoassay results. *J. Anal. Toxicol.* 24 (1): 17- 21.
- 24.** Camara, P.D., Audette, L., Velletri, K. and Griffiths, W.C. (1995). False-positive immunoassay results for urine benzodiazepine in patients receiving Oxaprozin (Daypro™). *Clin. Chem.* 41(1):115-116.
- 25.** Levine, B.S. and Smith, M.L. (1990). Effects of Diphenhydramine on immunoassays of phencyclidine in urine. *Clin. Chem.* 36 (6):1258.
- 26.** Rossi, S., Yaksh, T., Bentley, H., Van den Brande, G., Grant, I. and Ellis, R. (2006). Characterization of interference with 6 commercial D⁹-tetrahydrocannabinol immunoassay by Efavirenz (glucuronide) in urine. *Clin. Chem.* 52 (5): 896-897.
- 27.** Vázquez, E. Sustiva seems to cause prisoners to wrongly test positive for marijuana use [en línea]. *The Body. The complete HIV/AIDS resource.* November/December 2001. <<http://www.thebody.com/content/treat/art1002.html>> [Consulta: octubre 2007].
- 28.** Sinicco, A., Raiteri, R., Rossati, A., Savarino, A. and Di Perri, G. (2000). Efavirenz interference in estradiol ELISA assay. *Clin. Chem.* 46 (5): 734-735.
- 29.** Solid phase extraction applications manual (1999). Ed. United Chemical Technologies, Inc. Pennsylvania, p.26
- 30.** Índice actualizado de especialidades medicinales (DPF) (2001). Número 42. Ed. AP Americana de publicaciones S.A. Buenos Aires, Argentina.
- 31.** Solid phase extraction applications manual (1999). Ed. United Chemical Technologies, Inc. Pennsylvania, p.6

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- En todos los casos se deberá consignar en el ángulo superior derecho de cada hoja el apellido del autor o del primer autor y el número correlativo que corresponda, incluidas las páginas con Tablas.
- En el caso de sustancias químicas se tomará como referencia prioritaria a las normas de la IUPAC.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El formato de las citas es el siguiente:

Artículo en publicación periódica:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exchange is kindly requested with journals the scope and purpose 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 Comitê Editorial. Este processo determinará que o mencionado Comitê 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 Comitê Editorial.

Os comentários bibliográficos serão contribuições solicitadas pelo Diretor.

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

da edição.

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

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

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

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

- No caso de substâncias químicas, se adotará como 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 conta 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 M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and Cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochim. Hydrobio.* 17(1), 101-107."
 - Livro: "Dix, H.M. (1981), *Environmental pollution*. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."
 - As abreviações do nome das revistas serão as que elas mesmas indiquem no texto.
 - Qualquer modificação excepcional das normas estipuladas que os autores solicitem será considerada pelo Diretor.
 - As provas de impressão serão enviadas ao autor indicado como receptor da correspondência.
 - As mesmas serão revistas e devolvidas dentro de 48 horas após recebidas.
 - O autor indicado receberá 10 separatas sem despesa. O excedente solicitado sobre essa quantidade será custeado por ele ou demais autores; a quantidade solicitada deverá ser comunicada ao Editor no momento de devolver as provas de impressão.
- Toda a correspondência relativa à *Acta Toxicológica Argentina* deverá ser dirigida ao Comitê 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*.