

ISSN 0327-9286

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 18
N° 2
Diciembre 2010

Acta Toxicológica Argentina es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través de SciELO Argentina. Tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, resúmenes de tesis, cartas al editor y noticias.



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

*Acta
Toxicológica
Argentina*

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión Directiva

Presidente

Gerardo D. Castro

Vicepresidente

Marta A. Carballo

Tesorero

María L. Oneto

Secretaria

Adriana S. Ridolfi

Vocales

Fabiana L. Lo Nostro

Patricia N. Quiroga

María T. Yanicelli

Vocales Suplentes

Marcela M. López Nigro

Mónica C. Napoli

Carlos R. Mastandrea

Comité Científico

Nelson Albiano

José A. Castro

Lucrecia Ferrari

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Organo de Fiscalización

Mirta E. Ryczel

Claudia V. Vassena

Viviana V. Crapanzano

Tribunal de Honor

Susana I. García

Irma Giolito

Augusto Piazza

Acta Toxicológica Argentina

Director

Adolfo R. de Roodt *INPB, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; Fac. Medicina, UBA*

Comité de Redacción

Ofelia C. Acosta de Pérez, *Fac. Ciencias Vet. UNNE, CONICET*

Fabiana L. Lo Nostro, *Fac. C. Exactas y Naturales, UBA; CONICET*

Valentina Olmos, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

Adriana S. Ridolfi, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

Aldo S. Saracco, *Fac. Ciencias de la Salud, UM; MSAL Gob. de Mendoza*

Comité Editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

José A. Castro, *CITEFA, CONICET, Argentina*

Fernando Díaz Barriga, *Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

Heraldo N. Donnerwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

Gina D'Suze, *IVIC, Venezuela*

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

Veniero Gambaro, *Università di Pavia, Italia*

Estela Giménez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

José M. Monserrat, *Universidad de Río Grande, Brasil*

Irma R. Pérez, *Universidad Autónoma de México, México*

Haydée N. Pizarro, *CONICET, Argentina*

María del C. Ríos de Molina, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

María M. Salseduc, *Laboratorios Bagó, Argentina*

Carlos Sèvcik, *IVIC, Venezuela*

Francisco O. de Siqueira França, *Instituto Butantan, Brasil*

Norma Vallejo, *SEDRONAR, Argentina*

Edda Villaamil Lepori, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Eduardo N. Zerba, *CIPEIN-CITEFA, CONICET, Argentina*

INDICE

(CONTENTS)

| | |
|--|----|
| CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR INYECCIÓN EN FLUJO-GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (IF-GH-EAA) PREVIA DERIVATIZACIÓN CON L-CISTEÍNA. VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN INTERMETODOLÓGICA UTILIZANDO DOS TÉCNICAS DE REFERENCIA <i>Navoni, Julio A.; Olivera, Nancy M.; Villaamil Lepori, Edda C.</i> | 29 |
| BUENAS PRÁCTICAS DE APLICACIÓN EN CULTIVOS PLANOS EXTENSIVOS. DISTANCIAS A ZONAS URBANAS. CRITERIOS Y SOLUCIONES <i>Etiennot, Alberto; Piazza, Augusto</i> | 40 |
| DETERMINAÇÃO DE METAIS CLASSIFICADOS COMO DE IMPORTÂNCIA TOXICOLÓGICA NO MOLUSCO BIVALVE <i>Anadara notabilis</i> (Röding, 1798) ENCONTRADO EM GALINHOS, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL <i>Urbano de Araújo, Marcos A.; Vitória de Moura, Maria F.; Borges de Carvalho, Genickson</i> | 54 |
| ADENDA | 59 |
| INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES | 63 |

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

Acta Toxicológica Argentina (ISSN 0327-9286), órgano oficial de la Asociación Toxicológica Argentina (ATA)

Se publica bianualmente. Registro de la Propiedad Intelectual Nº 689376

Alsina 1441 Of. 302 (1088) Buenos Aires - Argentina. Tel/Fax: 54-11 4381-6919

CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR INYECCIÓN EN FLUJO-GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (IF-GH-EAA) PREVIA DERIVATIZACIÓN CON L-CISTEÍNA. VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN INTERMETODOLÓGICA UTILIZANDO DOS TÉCNICAS DE REFERENCIA

Navoni, Julio A.*; Olivera, Nancy M.; Villaamil Lepori, Edda C.

Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Aseoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA) Junín 956, 7° piso (1113) Buenos Aires, Argentina Tel/fax: 0054-11-4964-8283, 0054-11-4964-8284.

* Autor a quien dirigir correspondencia: jnavoni@ffyb.uba.ar

Recibido: 26 de agosto de 2009
Aceptado: 11 de diciembre de 2009
Versión final recibida: 7 de diciembre de 2010

Resumen: CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR INYECCIÓN EN FLUJO-GENERACIÓN DE HIDRUROS-ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (IF-GH-EAA) PREVIA DERIVATIZACIÓN CON L-CISTEÍNA. VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN INTERMETODOLÓGICA UTILIZANDO DOS TÉCNICAS DE REFERENCIA. Julio A. Navoni, Nancy M. Olivera, Edda C. Villaamil Lepori. *Acta Toxicol. Argent. 2010 18 (2): 29-38*. La presencia de Arsénico (As) en aguas de consumo representa una problemática para la salud pública en muchas regiones del mundo, incluida la Argentina. La cuantificación de arsénico en agua de bebida y en orina se utiliza para evaluar la exposición a este contaminante. El presente trabajo tuvo como objetivo la validación metodológica de una técnica para la cuantificación de especies del As [As^V + As^{III} + ácido monometilarsónico (MMA) + ácido dimetilarsínico (DMA)] por inyección en flujo-generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA), previa derivatización con L-cisteína. Los resultados fueron comparados con los obtenidos utilizando dos metodologías de referencia, generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (GH-EAA) para muestras de aguas y orina, y cromatografía de alta resolución -generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (HPLC-GH-EAA) para muestras de orina. Además, se evaluó la selectividad de la cuantificación por IF-GH-EAA, en presencia de otras especies químicas del As, provenientes del consumo de alimentos producto de la pesca, a través de un ensayo biológico. Los niveles de As hallados en las muestras de agua y de orina utilizando las técnicas de referencia presentaron un rango de 6 a 176 µg/L y de 143 a 3312 µg/g de creatinina, respectivamente. Los coeficientes de Pearson resultantes de la comparación de los datos obtenidos por IF-GH-EAA, con los logrados por los métodos de referencia fueron $r = 0,9976$ y $r = 0,9422$, para agua y orina, respectivamente. Los resultados de la prueba biológica indicaron un mayor nivel de As, debido al consumo de alimentos producto de la pesca, cuando las muestras de orina fueron previamente mineralizadas (GH-EAA), con la consecuente sobreestimación del contenido de As proveniente del consumo de As inorgánico. Este aumento no se observó cuando éstas fueron analizadas por IF-GH-EAA. Los valores, encontrados utilizando IF-GH-EAA, resultaron comparables al nivel basal previo al consumo. Los resultados obtenidos indican que la metodología propuesta es una alternativa válida para evaluar la exposición a As inorgánico sin necesidad de utilizar prolongados pre-tratamientos, resultando más económica y rápida y evitando la sobreestimación por medición de otras especies del arsénico de bajo impacto toxicológico.

Palabras clave: Arsénico; L-cisteína; Generación de hidruros; Validación metodológica

Abstract: ARSENIC QUANTITATION BY FLOW INJECTION- HYDRIDE GENERATION- ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY (FI-HG-AAS) AFTER L-CYSTEINE DERIVATIZATION. VALIDATION AND INTER-METHODOLOGICAL COMPARISON USING TWO REFERENCE TECHNIQUES. Julio A. Navoni, Nancy M. Olivera, Edda C. Villaamil Lepori. *Acta Toxicol. Argent. 2010 18 (2): 29-38*. The presence of arsenic (As) in drinking water is a public health concern in many regions of the world, including Argentina. Quantification of arsenic in drinking water and urine are used to assess exposure to this pollutant. This study aimed to validate a methodology for the quantification of As species [As^V + As^{III} + acid monometilarsónico (MMA) + dimetilarsínico acid (DMA)] by flow injection-hydrate generation-atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS), after derivatization with L-cysteine. The results were compared with those obtained using two methods of reference, hydrate generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS) for water and urine samples, and high performance liquid chromatography-hydrate generation-atomic absorption spectrometry (HPLC-HG-AAS) for urine samples. In addition, the selectivity of quantification by FI-HG-AAS in the presence of other chemical species of As, from fishery products intake, was evaluated through a biological assay. The As level found in water and urine samples, using the techniques of reference, showed a range from 6 to 176 µg/L and from

143 to 3312 µg/g creatinine, respectively. Pearson coefficients resulting from the comparison of data obtained by FI-HG-AAS with those achieved by the reference methods were $r = 0.9976$ and $r = 0.9422$ for water and urine, respectively. The results of the biological test showed a higher level of As, due to consumption of food fishery product, when urine samples were previously mineralized (HG-AAS), with consequent overestimation of the inorganic arsenic consumption. When these samples were analyzed by FI-HG-AAS this fact was not observed, and the values were comparable to baseline level prior to consumption. The results indicate that the proposed methodology is a valid alternative for assessing exposure to inorganic arsenic without the use of prolonged pre-treatment, resulting cheaper and faster, and avoiding the overestimation for measuring other arsenic species of low toxicology impact.

Keywords: Arsenic; L-cysteine; Hydride generation; Methodological validation

INTRODUCCIÓN

La exposición a arsénico inorgánico a través de la dieta puede provocar la aparición de múltiples efectos sobre la salud, conocidos como hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) (Bergoglio 1963; Biagini 1975). En la actualidad millones de personas están expuestas a concentraciones elevadas de As en el agua, consideradas perjudiciales para la salud (Caussy 2003; WHO 2004; Mukherjee y col. 2006). La cuantificación de As en muestras de agua y orina es una herramienta útil para evaluar exposición a este contaminante (Dang y col. 1999; Hinwood y col. 2002; Caceres y col. 2005; Chen y col. 2005; IPCS 2009). Existe una amplia gama de metodologías analíticas entre las cuales las de absorción, emisión y fluorescencia atómica son las más difundidas por su especificidad y sensibilidad (Gong y col. 2002).

En la bibliografía, se hallan descriptos numerosos procedimientos para la detección del As siendo los métodos por absorción atómica los más utilizados. Estas metodologías se realizan con diferentes variantes: atomización electrotérmica (horno de grafito) (Zhe-ming y col. 1996) y atomización por llama acoplada a generador de hidruros. Esta última presenta la mayor sensibilidad y versatilidad a fin de acoplar distintos procedimientos separativos que permiten cuantificar las especies del As presentes en la muestra (Burguera y Burguera 1997; Crecelius y Yager 1997; Guo y col. 1997; Muñoz y col. 1999; Samanta y col. 1999; Carrero y col. 2001; Michalke 2003).

La mayoría de las técnicas utilizadas en la actualidad para la determinación de As urinario requieren una mineralización previa de la muestra (Samanta y col. 1999). Este tratamiento provoca la destrucción total de la materia orgánica presente, llevando el total del As a su máximo estado de oxidación en su forma inorgánica. La presencia en la dieta de

arsenobetaina (AsB) o de arsenocolina (AsC), especies de bajo impacto toxicológico presentes en alimentos producto de la pesca, puede llevar a sobredimensionar el contenido de arsénico cuando se utiliza un procedimiento de mineralización exhaustivo como lo es en el caso de la cuantificación por GH-EAA (Muñoz y col. 2002). En estos casos, para una correcta interpretación del resultado, es necesario contar con información acerca de los hábitos alimenticios del paciente tres días previos a la toma de muestra (Suzuki y col. 2002).

Otra variante son las técnicas de especiación, que consisten en el acoplamiento de un sistema separativo al sistema de detección, lo cual permite cuantificar en forma aislada, las distintas especies químicas que se forman por el metabolismo del As inorgánico, como así también la presencia de otras especies arsenicales como la AsB y la AsC (Burguera y Burguera 1997; Crecelius y Jager 1997).

Otras metodologías son capaces de cuantificar conjuntamente el As inorgánico y los productos del metabolismo de éste: el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA), que en este trabajo denominaremos As_{L-Cys} ($As_{L-Cys} = As^V + As^{III} + MMA + DMA$) (Guo y col. 1997; Carrero y col. 2001).

Estos procedimientos se basan en una derivatización selectiva de las especies antes nombradas, y no fueron lo suficientemente difundidos como métodos alternativos para la valoración de la exposición a As, en gran medida, por el advenimiento de las técnicas de especiación.

En un trabajo previo realizado por este grupo de investigación, se demostró in vitro las bondades del proceso de cuantificar As_{L-Cys} por el método propuesto de IF-GH-EAA (Navoni y col. 2009).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica validada, a través de la comparación intermetodológica entre los resultados obtenidos

en la cuantificación de As en muestras reales de agua y orina por IF-GH-EAA con los obtenidos a través de dos metodologías de referencia GH-EAA, y HPLC-GH-EAA.

Además, se estudió la selectividad del proceso, en caso de posibles sobreestimaciones por cuantificación de las especies de bajo impacto toxicológico (consumo de productos de la pesca), a través de un ensayo biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todas las drogas sólidas y líquidas usadas fueron de grado analítico. El MMA fue provisto por Chem Service, EEUU. El DMA fue provisto por Sigma, EEUU. Los estándares de As^{III} y As^V junto con el ácido clorhídrico, el tetrahidrobórato de sodio, la L-cisteína, el ácido nítrico, el ácido ascórbico, el yoduro de potasio, el óxido de magnesio, el nitrato de magnesio y el hidróxido de sodio, fueron provistos por Merck Química Argentina. El fosfato monobásico de amonio fue provisto por Baker Analyzed, EEUU. El nitrógeno, el aire y el acetileno fueron de calidad ultrapura provistos por INDURA S.A, Argentina. Para todos los procesos se empleó agua desionizada (18,2 MΩ cm).

Equipamiento

La cuantificación de As total (AsT) fue realizada por GH-EAA usando un espectrómetro de absorción atómica (EAA) (modelo AA 475, Varian[®]) equipado con un generador de hidruros (GH) (VGA77, Varian[®]) y una celda de cuarzo calentada por llama aire/acetileno a 900°C.

La determinación de As_{L-Cys} fue realizada por IF-GH-EAA acoplado un sistema de inyección manual (Reodyne 7125) al equipo antes mencionado.

La determinación de As a través de la cuantificación de especies As^V, As^{III}, MMA y DMA (As₂) fue realizada por cromatografía de alta performance-generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica HPLC-GH-EAA. El proceso cromatográfico fue realizado utilizando una bomba cuaternaria P4000 y un sistema de inyección automático AS3000 (Thermo-separation Products[®]) acoplado al sistema señalado de GH-EAA descrito previamente.

Otros equipamientos utilizados incluyeron: baño seco (PC3025, FAC, Argentina); Horno mufla (Indef 271, Argentina).

Muestras

Las muestras de orina utilizadas en este trabajo

provinieron de Monte Quemado, Dpto. Copo, Santiago del Estero (GPS: 25° 48' 60" S, 62° 52' 00" O), zona endémica de hidroarsenicismo (Navoni y col. 2006; Navoni y col. 2007). Los participantes fueron entrevistados con el objeto de recabar información acerca de sus hábitos alimentarios, constatándose la ausencia de consumo de alimentos producto de la pesca dentro de la semana previa a la recolección de la muestra.

Las muestras de agua procedieron en su totalidad de fuentes para consumo humano provenientes de distintas zonas de la provincia de Buenos Aires y fueron recolectadas siguiendo el protocolo estandarizado de toma de muestra para la cuantificación de As (Department of Ecology 1996).

La precisión y veracidad fueron evaluadas mediante la utilización de muestras de orina fortificadas con arsénico, preparadas por agregado de As^V a una orina blanco (AsT = 8 µg/L) a fin de obtener una concentración teórica final de 25 µg/L. Se procedió de igual manera para agua por agregado de As^V a una muestra de agua de consumo (AsT = 2 µg/L) a fin de obtener una concentración teórica final de 50 µg/L. Los resultados de imprecisión fueron expresados como: coeficiente de variación porcentual (CV%) y los de veracidad como sesgo.

Además, se evaluó la exactitud del proceso, mediante el análisis de materiales de referencia certificados (MRC), EP-H-2, EnviroMAT y Biorad nivel 2, Lyphochek[®] para agua y orina respectivamente.

Ensayo biológico

Para verificar la selectividad de la metodología propuesta, se realizó una prueba biológica cuantificando As por GH-EAA, y por IF-GH-EAA en muestras de orina de personas clínicamente sanas, previo y posteriormente al consumo de alimentos producto de la pesca. A tal efecto 4 voluntarios, quienes consumen agua potable con un valor medio de As en el agua de 2 µg/L (agua de red de Capital Federal) ingirieron una única porción de 150 gr de merluza cocinada convencionalmente. Se recolectaron muestras de orina antes y a las 12, 24, 48 y 72 hs posteriores al consumo. Todas las muestras de orina fueron mantenidas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Procedimientos

Determinación de AsT por GH-EAA

El análisis en orina y agua fue realizado, a través

del método descrito por Muñoz y col. (2002) modificado. Brevemente, las muestras de orina (10 mL) fueron tratadas con 3,0 mL de una suspensión de agente de mineralización [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 20% p/v + MgO 2% p/v, y 10 mL de NO_3H concentrado]. La mezcla fue llevada a sequedad en una manta térmica para luego ser tratada a mayor temperatura (450°C) en una mufla, por un lapso de 12 horas. Las cenizas blancas obtenidas luego de este tratamiento fueron disueltas en 5 mL de HCl 6 M. Las muestras de agua de consumo fueron directamente tratadas colocando 2,5 mL de la muestra a las que se le adicionaron 2,5 mL de HCl concentrado a fin de lograr una concentración final de HCl 6 M. Las muestras fueron pre-reducidas por agregado de 5 mL de solución reductora [IK 5% p/v y ácido ascórbico 5% p/v]. La cuantificación se realizó interpolando en una curva de calibración externa, de soluciones con concentraciones crecientes de As^{V} , las que fueron tratadas de igual manera que las muestras. La mezcla resultante fue mantenida por 30 minutos a temperatura ambiente a fin de permitir la completa conversión del arsénico inorgánico a su forma trivalente. La solución fue llevada a un volumen final de 25 mL en matraz aforado con HCl 6 M. Las condiciones optimizadas de generación de arsinas para la cuantificación de AsT fueron: NaBH_4 0,7% p/v en NaOH 0,5% p/v, a un flujo de 1 ml/min; HCl 6 M, a un flujo de 1 ml/min. La velocidad de ingreso de la muestra/estándares en el generador de hidruros fue de 5 ml/min. La lectura se logró haciendo reaccionar muestra y reactivos, al flujo previamente indicado, por un tiempo de 40 segundos, con el objeto de garantizar que la generación de arsinas alcance un máximo estable en el cual la medición fuese realizada. Las condiciones de lectura para el equipo de espectrometría de absorción atómica fueron: longitud de onda 193,7 nm; apertura de rendija de 0,5 nm; fuente de energía lámpara de cátodo hueco con una intensidad de corriente de 6 mA; temperatura de celda 900°C . Las características analíticas del método fueron: límite de detección: 0,3 $\mu\text{g/L}$ para agua y de 0,6 $\mu\text{g/L}$ para orina.

Determinación de $\text{As}_{\text{L-Cys}}$ por IF-GH-EAA

El análisis en muestras orina y agua fue realizado utilizando la metodología desarrollada y validada previamente (Navoni y col. 2009). Las muestras (0,5 mL) fueron derivatizadas

por agregado de 0,5 mL de una solución de L-cisteína al 4% p/v en HCl 0,03 M. La cuantificación se realizó mediante curva de calibración externa de As^{V} en medio acuoso. Las condiciones optimizadas de generación de arsinas para la cuantificación fueron: NaBH_4 1% p/v en NaOH 0,05% p/v, a un flujo de 1 mL/min; HCl 0,4% v/v, a un flujo de 1 mL/min. Las condiciones instrumentales del espectrómetro de absorción atómica fueron las descritas previamente. Tanto las muestras como los testigos (200 μL) fueron inyectados en flujo. Las señales obtenidas fueron colectadas y analizadas utilizando el software Chromquest Chromatographic Work Station (Thermoquest Products). Las características analíticas del método fueron: límite de detección: 2 $\mu\text{g/L}$ para agua y de 3 $\mu\text{g/L}$ para orina.

Determinación de especies arsenicales As^{V} , As^{III} , MMA y DMA (As_2) en muestras de orina por HPLC-GH-EAA

La cuantificación de las especies arsenicales en las muestras de orina fue realizada siguiendo el procedimiento descrito y optimizado por Vélez y col. (1996). Se tomaron 100 μL de orina, previamente filtrada utilizando filtros de 0,45 μm , y se inyectaron en el cromatógrafo. El sistema cromatográfico estuvo provisto de una columna de intercambio aniónico Hamilton PRP X100 Phenomenex® de 250 x 4,1 mm y 10 μm de tamaño de partícula. Las fases móviles utilizadas fueron soluciones de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 mM (buffer A) y 20 mM (buffer B) a pH 5,75. El tiempo de corrida fue de 15 min. Las condiciones de generación de hidruros fueron: NaBH_4 1,5% p/v en NaOH 0,5% p/v, a un flujo de 1 ml/min; HCl 1,5 M, a un flujo de 1 mL/min. Las condiciones instrumentales del espectrómetro de absorción atómica fueron las descritas previamente. Las señales cromatográficas fueron colectadas a través del acoplamiento del espectrómetro con el equipo de HPLC. Se utilizó el software Chromquest Chromatographic work station (Thermoquest products) para la recolección y el análisis de los datos. Las características analíticas del método para la cuantificación de especies inorgánicas (As^{III} y As^{V}), MMA y DMA fueron: límite de detección: 10,0 $\mu\text{g/L}$ en todos los casos. La exactitud del proceso fue evaluada a través de la cuantificación de las soluciones stock de las distintas especies utilizadas, mediante el procedimiento descrito para As total por GH-EAA.

Determinación de creatinina urinaria

Los niveles de As urinario fueron corregidos de acuerdo a la concentración de creatinina de cada muestra. La determinación de creatinina fue realizada usando el método de Jaffé utilizando un kit comercial WIENER LAB®.

Estadísticos

La comparación intermetodológica fue realizada utilizando la prueba t para muestras pareadas.

La correlación intermetodológica fue realizada utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las metodologías utilizadas en este trabajo fueron desarrolladas y validadas previamente, teniendo en cuenta los requerimientos básicos de validación (FDA 2001; Official Journal of the European Union 2002; Thompson y col. 2002). Las características analíticas del método IF-GH-EAA, para determinar As_{L-Cys} permitieron la cuantificación de As en agua y orina ratificando las observaciones descriptas previamente (Guo y col. 1997; Carrero y col. 2001; Navoni y col. 2009). El rango dinámico de trabajo fue significativamente superior para la metodología propuesta comparado con el definido para GH-EAA (Tabla 1). Los límites de detección y cuantificación para IF-GH-EAA fueron superiores comparados con los obtenidos por GH-EAA (Tabla 2). No obstante, éstos fueron lo suficientemente bajos para cuantificar concentraciones de As, de acuerdo a los niveles vigentes en el Código Alimentario Argentino (CAA 2010) para muestras de aguas de consumo, y para muestras de orina, en concentraciones consideradas sin riesgo para la salud humana (ACGIH 2001). La precisión y la exactitud, en la cuantificación de As por IF-GH-EAA y GH-EAA, fueron evaluadas mediante la cuantificación de As_{L-Cys} y AsT respectivamente en muestras fortificadas de agua y orina. Las concentraciones teóricas finales de las muestras fortificadas fueron seleccionadas considerando para agua la concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ (valor máximo aceptado por el CAA hasta abril de 2010) y para muestras de orina una concentración teórica de 25 $\mu\text{g/L}$ considerando el valor de referencia para población no expuesta laboralmente (Navoni y col. 2004). La Tabla 3 describe los resultados obtenidos en análisis independientes sobre dichas muestras. Los resultados obtenidos de

As_{L-Cys} por IF-GH-EAA fueron similares a los obtenidos utilizando la técnica de referencia GH-EAA. En todos los casos la imprecisión fue menor al 10%.

Tabla 1. Parámetros de las curvas de calibración para cuantificar AsT y As_{L-Cys} por GH-EAA y IF-GH-EAA, respectivamente

| Parámetro | GH-EAA | IF-GH-EAA |
|--|-------------------|-------------------|
| Rango de concentración ($\mu\text{g/L}$) | 1 - 8 | 5 - 75 |
| Coefficiente de correlación | 0,998 \pm 0,001 | 0,999 \pm 0,002 |
| Pendiente | 0,031 \pm 0,002 | 47377 \pm 1035 |
| Intersección eje Y | 0,005 \pm 0,002 | 19434 \pm 1236 |
| Puntos de calibración | 4 | 5 |

Datos obtenidos a partir de 5 curvas de calibración preparadas y procesadas independientemente. Resultados expresados como promedio \pm desvío estándar (DE). El análisis de datos fue realizado para AsT en función absorbancia y As_{L-Cys} en función área de pico.

Tabla 2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para cuantificar AsT y As_{L-Cys} en cada matriz estudiada

| Matriz | GH-EAA | | IF-GH-EAA | |
|---------------------------|--------|----|-----------|----|
| | LD | LC | LD | LC |
| Agua ($\mu\text{g/L}$) | 1 | 1 | 2 | 5 |
| Orina ($\mu\text{g/L}$) | 1 | 2 | 3 | 8 |

Tabla 3. Precisión y exactitud en la cuantificación de AsT y As_{L-Cys} en muestra de agua y orina fortificadas con As^V

| Matriz | orina | | agua | |
|--------------------------|--------------|------|--------------|-----|
| | As_{L-Cys} | AsT | As_{L-Cys} | AsT |
| N= | 9 | 13 | 10 | 10 |
| Prom ($\mu\text{g/L}$) | 26 | 24 | 51 | 51 |
| DE ($\mu\text{g/L}$) | 2,0 | 2,0 | 1,6 | 1,4 |
| Imprecisión (CV%) | 7,7 | 9,2 | 3,1 | 2,7 |
| Inexactitud (Sesgo %) | 4,2 | -4,0 | 2,0 | 2,0 |

Datos obtenidos a partir de determinaciones independientes.

La dispersión de los resultados indicó que ambas metodologías presentan una variabilidad comparable. La cuantificación en muestras de agua presentó una imprecisión al menos dos veces inferior a la encontrada

al analizar muestras de orina, indicando un posible efecto matricial. La inexactitud fue, en todos los casos, menor al 5%. Los MCR fueron seleccionados considerando niveles de alta exposición. En la *Tabla 4* se describen los

resultados establecidos en el análisis de dichos materiales. Los resultados encontrados utilizando los métodos IF-GH-EAA y GH-EAA no mostraron diferencias significativas con los declarados por el fabricante.

Tabla 4. Análisis de materiales de referencia (veracidad) en la cuantificación de AsT y As_{L-Cys}

| Matriz | Nombre | Marca | Valor de referencia y rango | Valor promedio y rango establecido (As T) | Valor promedio y rango establecido (As _{L-Cys}) |
|--------------|---------------------|------------|-----------------------------|---|---|
| Agua (µg/L) | EP-H-2 | Enviro-MAT | 159,0; (155,0-164,0) | 157; (153-160) | 158; (155-162) |
| Orina (µg/L) | Lyphochek ® nivel 2 | Biorad | 153,0; (123,0-184,0) | 157; (152-164) | 150; (144-156) |

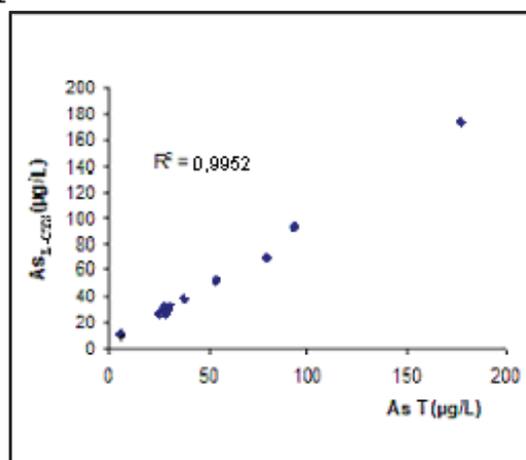
Los resultados descriptos fueron obtenidos a partir de 6 determinaciones independientes.

Se realizó el análisis de correlación de resultados obtenidos en muestras de agua y orina (*Figura 1*). Los niveles de AsT en muestras de agua cubrieron un rango de concentraciones de 6 a 176 µg/L. Estos datos fueron correlacionados con los de As_{L-Cys}, presentando una correlación significativa ($P < 0,0001$) (*Figura 1A*). Un análisis similar fue realizado en muestras de orina considerando los valores obtenidos de As_x, con los encontrados de As_{L-Cys} (*Figura 1B*). Los valores de As_x presentaron una correlación significativa ($P < 0,0001$) respecto a los de As_{L-Cys}.

La variabilidad promedio en la recuperación, considerando los valores obtenidos por las técnicas de referencia, fue superior en muestras de orina que en muestras de agua: (CV%) 18 vs 9, respectivamente. El efecto matricial concuerda con las observaciones presentadas previamente (*Tabla 5*).

A través del ensayo biológico se estudió la posibilidad de que otras especies arsenicales, presentes en la orina luego del consumo de alimentos de origen marino, puedan generar algún tipo de aporte a la medición de As_{L-Cys}. Las muestras de orina fueron analizadas a fin de determinar el AsT y el As_{L-Cys} presente. Luego del consumo de alimentos producto de la pesca, se observó un incremento significativo en los niveles de AsT, que superó, en promedio, 6 veces el contenido basal de éste, observándose un máximo a las 12 horas post ingesta (*Figura 2*). El proceso de mineralización fue lo suficientemente drástico para destruir la

A



B

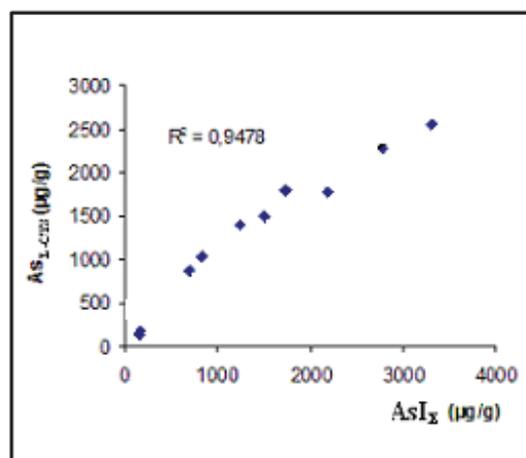


Figura 1. Correlación de los niveles de As_{L-Cys} obtenidos por IF-GH-EAA con los obtenidos por GH-EAA (agua) (A) y HPLC-GH-EAA (orina) (B), respectivamente.

Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos por IF-GH-EAA con los logrados utilizando las técnicas de referencia GH-EAA y HPLC-GH-EAA en agua y orina respectivamente. Los resultados se expresaron como recuperación porcentual (Rec %).

| Agua ($\mu\text{g/L}$) | | | | Orina ($\mu\text{g/g}$) | | | |
|--------------------------|---------------------|------|----------|---------------------------|---------------------|------------------|----------|
| Muestra | As _{L-Cys} | AsT | Rec (%)* | Muestra | As _{L-Cys} | AsI ₂ | Rec (%)* |
| 1 | 28 | 29 | 96 | 1 | 1400 | 1241 | 113 |
| 2 | 29 | 29 | 102 | 2 | 1048 | 834 | 126 |
| 3 | 38 | 38 | 98 | 3 | 1510 | 1503 | 100 |
| 4 | 70 | 80 | 88 | 4 | 880 | 691 | 127 |
| 5 | 94 | 93 | 101 | 5 | 2286 | 2785 | 82 |
| 6 | 7 | 6 | 123 | 6 | 2552 | 3312 | 77 |
| 7 | 28 | 26 | 108 | 7 | 1788 | 2186 | 82 |
| 8 | 28 | 26 | 107 | 8 | 173 | 171 | 101 |
| 9 | 173 | 177 | 98 | 9 | 136 | 153 | 89 |
| 10 | 52 | 54 | 97 | 10 | 1793 | 1726 | 104 |
| 11 | 31 | 30 | 103 | | | | |
| | | Prom | 101,9 | | | Prom | 100,1 |
| | | DE | 8,9 | | | DE | 17,9 |
| | | CV% | 8,7 | | | CV% | 17,9 |

*la recuperación se realizó considerando el valor obtenido por la técnica de referencia como el 100%. Prom: promedio, DE: desvío estándar, CV%: coeficiente de variación.

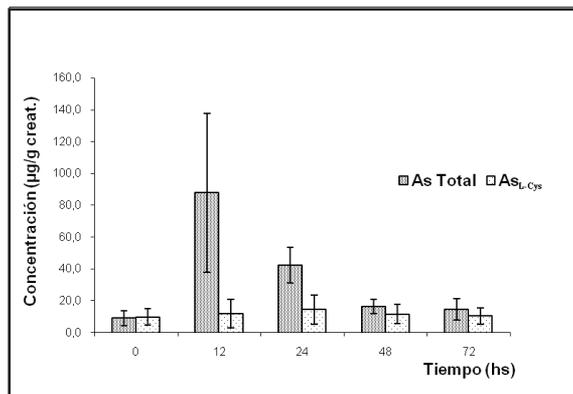


Figura 2. Niveles medios de arsénico urinario luego del consumo de productos de la pesca. AsT y As_{L-Cys} en muestras de orina de cuatro individuos clínicamente sanos antes de la ingesta de 150 g de merluza (0hs) y a 12, 24, 48 y 72 horas post ingesta. Las barras de error muestran un desvío estándar.

materia orgánica liberando el arsénico presente, generando así una mayor señal espectral. De acuerdo a esta experiencia, se pudo establecer un requerimiento mínimo de tres días de abstinencia de consumo de alimentos pesqueros, previo a la recolección de muestras de orina en el caso que se utilice la técnica de AsT para la cuantificación de arsénico, ratificando las observaciones realizada por otros

autores (Carrero y col. 2001). El contenido de As_{L-Cys} fue comparable en todas las muestras, independientemente del momento de recolección, y comparables con el valor basal previo al consumo. Estas observaciones demuestran la mayor selectividad que presenta la cuantificación por IF-GH-EAA, en comparación a la técnica de referencia GH-EAA.

El entorno químico en muestras de agua (pH, solutos disueltos, iones en elevadas concentraciones tales como Fe, Cu, Co, Mo, Cd y Zn) puede alterar el proceso de generación de arsinas impactando en el resultado con la consecuente subestimación del valor real de arsénico presente (Chen y col. 1992). Los resultados comparables observados en el análisis de muestras reales indican la utilidad del método IF-GH-EAA. La comparación de los datos obtenidos por especiación con los de As_{L-Cys} de muestras de orina provenientes de personas expuestas al As inorgánico, demuestra la selectividad para la cuantificación de As proveniente del consumo de arsénico inorgánico, observación ratificada en el ensayo biológico. Otros aspectos a tener en cuenta son el tiempo necesario para el procesamiento y el costo de los insumos y reactivos necesarios. Comparativamente, el método IF-GH-EAA presenta un tiempo de procesamiento significativamente

menor, asociado a esto ofrece una reducción en el costo, por la menor cantidad de insumos y reactivos requeridos. Estas observaciones suman valor agregado a la implementación de esta metodología.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el método IF-GH-EAA presenta una performance analítica útil para la cuantificación de As inorgánico y sus metabolitos en muestras de agua y orina en forma específica, rápida y a menor costo, sin la posibilidad de sobreestimar el nivel de As total en muestras de orina por consumo de alimentos producto de la pesca que contengan especies arsenicales de bajo impacto toxicológico.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Threshold Limit Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs). Cincinnati, Ohio: ACGIH, 2001.

Bergoglio R. M. Mortalidad por cáncer y tumores malignos en zonas de aguas arsenicales de la provincia de Córdoba. Actas finales, V Congreso Ibero-Latino-Americano de Dermatología. 1963;1111.

Biagini R.E. Hidroarsenicismo crónico en la república Argentina. *Med Cut I.L.A.* 1975; (6):423-432.

Burguera M., Burguera J.L. Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. 1997;44(9):1581-1604.

Caceres D.D., Pino P., Montesinos N., Atalah E., Amigo H., Loomis D. Exposure to inorganic arsenic in drinking water and total urinary arsenic concentration in a Chilean population. *Environ Research.* 2005;98(2):151-159.

Carrero P., Malave A., Burguera J.L., Burguera M., Rondon, C. Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: Investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Analytica Chimica Acta.* 2001;438(1):195-204.

Caussy D. Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2003;56(1):164-173.

Chen H., Brindle I., Le X.C. Prereduction of arsenic(V) to arsenic(III), enhancement of the signal, and reduction of interferences by L-cysteine in the determination of arsenic by hydride generation. *Anal Chem.* 1992;64(6):667-672.

Chen J.C., Hsu L.I., Wang C.H., Shih W.L., Hsu Y.H., Tseng M.P., Lin Y.C., Chou W.L., Chen C.Y., Lee C.Y., Wang L.H., Cheng Y.C., Chen C.L., Chen S.Y., Wang Y.H., Husueh Y.M., Chiou H.Y., Wu M.M. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2005;206(2):198-206.

Código Alimentario Argentino (CAA). Bebidas hídricas, Agua y Agua gasificadas. [Actualizado a abril 2010, consulta 7 de mayo 2010]. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/codigoa/capitulo XII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/codigoa/capitulo%20XII.pdf).

Crecelius E., Yager J. Intercomparison of Analytical Methods for Arsenic Speciation in Human Urine. *Environ Health Perspec.* 1997;105(6):650-653.

Dang T.M.N., Tran Q.T., Vu K.V. Determination of arsenic in urine by atomic absorption spectrophotometry for biological monitoring of occupational exposure to arsenic. *Toxicology Letters.* 1999;108(2-3):179-183.

Department of Ecology, State of Washington [en línea]. Method 1669. Sampling Ambient Water for Trace Metals at EPA Water Quality Criteria Levels. 1996 [consulta agosto de 2008]. Department of Ecology, State of Washington. Disponible en: http://www.ecy.wa.gov/programs/wq/wastewater/method_1669.pdf.

Food and Drug Administration (FDA) [en línea]. Guidance for Industry. Bionalytical Method Validation. 2001. [actualizado al 11 de abril de 2010; consulta 27 de abril de 2010]. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center Veterinary Medicine (CVM). Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.

Gong Z., Lu X., Ma M., Watt C., Le C. Arsenic speciation analysis. *Talanta*. 2002;58(1):77-96.

Guo T., Baasner J., Tsalev D.L. Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 1997;349(1-3):313-318.

Hinwood A.L., Sim M. R., de Klerk N., Drummer O., Gerostamoulos J., Bastone E.B. Are 24-Hour Urine Samples and Creatinine Adjustment Required for Analysis of Inorganic Arsenic in Urine in Population Studies? *Environmental Research*. 2002;88(3):219-224.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) [en línea]. Environmental Health criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds. [actualizado al 30 de noviembre de 2004; consulta 10 de junio de 2009]. WHO. Disponible en: http://www.int/ipcs/publications/ehc_224/en/

Lindberg A.L., Ekstrom E.C., Nermell B., Rahman M., Lonnerdal B., Persson L., Vahter M. Gender and age differences in the metabolism of inorganic arsenic in a highly exposed population in Bangladesh. *Environ Res*. 2008;106:110-120.

Meza M. M., Yu L., Rodriguez Y.Y., Guild M., Thompson D., Gandolfi A.J., Klimecki W.T. Developmentally restricted genetic determinants of human arsenic metabolism: association between urinary methylated arsenic and CYT19 polymorphisms in children. *Environ Health Perspec*. 2005;113(6):775-781.

Michalke B. Element speciation definitions, analytical methodology and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003;56(1):122-139.

Miller J.C., Miller J.N. Errores en análisis instrumental; regresión y correlación. En: *Estadística para química analítica*. Wilmington, Delaware, EEUU: Addison-Wesley Iberoamericana; 1993. p. 87-121.

Mukherjee A., Sengupta M.K., Hossain M.A., Ahamed S., Das B., Nayak B., Lodh D., Rahman M., Chakraborti D. Arsenic contamination in groundwater: A global perspectives with emphasis on the Asian scenario. *J Health Popul Nut*. 2006;24(2):143-163.

Muñoz O., Díaz O.P., Leyton I., Núñez N., Devesa V., Súñer M.A., Vélez D., Montoro R. Vegetables collected in the cultivated Andean area of northern Chile: total and inorganic arsenic contents in raw vegetables. *J Agric Food Chem*. 2002;50(3):642-647.

Muñoz O., Vélez D., Montoro R. Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic (AsIII+AsV) in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analyst*. 1999;124(4):601-607

Navoni J., El Kassis Y., Piñeiro A., Sosa G., Pandolfo M., Kuprewicz A., López C., Villaamil Lepori E., Roses O. Valores de referencia de Arsénico total urinario en poblaciones no expuestas profesionalmente en el Área metropolitana de Buenos Aires. *Acta Toxicol Argent*. 2004;12(Supl.):19.

Navoni J.A., González Cid M., Olivera M., Tschambler J., Bovi Mitre G., Larripa I., Villaamil Lepori E. Daño al ADN asociado al contenido de arsénico urinario en una población de jóvenes expuesta al arsénico por el agua de bebida. *Acta Toxicol Argent*. 2006;14(Supl):48-51.23

Navoni J.A., Olivera M., Garcia S.I., Villaamil Lepori E. Evaluación de riesgo por ingesta de arsénico inorgánico en poblaciones de zonas endémicas argentinas. *La Alimentación Latinoamericana*. 2007;270:66-70.

Navoni J.A., Olivera N.M., Villaamil Lepori E.C. Optimización y validación metodológica de la cuantificación de arsénico por inyección en flujo-generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA) previa derivatización con L-cisteína. *Acta Toxicol Argent*. 2009;17(2):48-54.

Official Journal of the European Union [en línea] Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results [actualizado al 7 de abril de 2009, consulta 15 de junio de 2009]. Official Journal of the European Union. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>.

Samanta G., Chowdhury T., Mandal B., Biswas B., Chowdhury U., Basu G., Chanda C., Lodh D., Chakraborti D. Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry for Determination of Arsenic in Water and Biological Samples from Arsenic-Affected Districts of West Bengal, India and Bangladesh. *Microchemical Journal*. 1999;62(1):174-191.

Schawicke Engstrom K., Broberg K., Concha G., Nermell B., Warholm M., Vahter M. Genetic polymorphisms influencing arsenic metabolism: evidence from Argentina. *Environ Health Perspec.* 2007;115(4):599-605.

Suzuki K.T., Mandal B.K., Ogra Y. Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta*. 2002;58(1):111-119.

Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory

validation of methods of analysis. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2002;74(5):835-855.

Vélez D., Ybañez N., Montoro R. Optimization of the extraction and determination of monomethylarsonic and dimethylarsinic acids in seafood products by coupling liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1996;11(4):271-277.

World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1. Recommendations. Third Edition. Geneva:WHO, 2004.

Zhe-ming N., Zhu R., Mei L. Minimization of phosphate interference in the direct determination of arsenic in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry.

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

BUENAS PRÁCTICAS DE APLICACIÓN EN CULTIVOS PLANOS EXTENSIVOS. DISTANCIAS A ZONAS URBANAS. CRITERIOS Y SOLUCIONES

Etiennot, Alberto¹; Piazza, Augusto^{1,2}

¹Dyehuty Agropecuaria S.R.L. Alsina 1441, 2° piso, Of. 206 CABA. ²Universidad Argentina de la Empresa. etiennot@dyehuty.com, apiazza@dyehuty.com

Recibido: 8 de agosto de 2010
Aceptado: 26 de agosto de 2010

Resumen: BUENAS PRÁCTICAS DE APLICACIÓN EN CULTIVOS PLANOS EXTENSIVOS. DISTANCIAS A ZONAS URBANAS. CRITERIOS Y SOLUCIONES. Alberto Etiennot, Augusto Piazza. *Acta Toxicol. Argent. 2010 18 (2): 40-53*. El presente trabajo engloba todos los conocimientos actuales y disponibles técnico científicos con respecto a las aplicaciones de agroquímicos en proximidad a las zonas periurbanas y urbanas, considerando los diversos factores que contribuyen a un eficiente y eficaz trabajo agrícola, sugiriendo prácticas y estableciendo distancias a favor de la seguridad de la población y de las Buenas Prácticas Agrícolas. Concluyendo en un cuadro de sugerencias basado en la toxicidad aguda de los agroquímicos

Palabras clave: Distancias; Agroquímicos; Aplicaciones; Buenas prácticas agrícolas.

Abstract: GOOD PRACTICES OF APPLICATION ON EXTENSIVE FLAT CROPS. DISTANCES TO URBAN AREAS. CRITERIONS AND SOLUTIONS. Alberto Etiennot, Augusto Piazza. *Acta Toxicol. Argent. 2010 18 (2): 40-53*. The present document includes the whole current and available scientific technical knowledge regarding to the agrichemical applications next to the rural-urban and urban zones, considering the several factors that contribute to an efficient and effective agricultural work, suggesting practices and establishing distances in favour of the population's security and of the Good Agricultural Practices. Concluding in a picture of suggestions based on the acute toxicity of the agrichemicals.

Key words: Distances; Agrochemicals; Applications, Good Agricultural Practices.

INTRODUCCIÓN

La consideración sobre el ambiente está creciendo en la sociedad como punto de atención, esto está demostrado por el alto grado de preocupación puesto de manifiesto en la producción agropecuaria, particularmente en los últimos tiempos, en lo referente al uso de los agroquímicos.

La utilización de los productos fitosanitarios en la producción de alimentos representa un beneficio innegable, garantizando una mayor producción de los mismos bajo normas de calidad y haciendo que ésta sea mucho más estable (Association of Food and Drugs 1965). Sin embargo, la aplicación de estos insumos en forma inapropiada y desaprensiva entraña posibles riesgos tóxicos para la salud ya sea en forma accidental o por un manejo inadecuado de dichos productos (Costa y col. 1997).

Debido al desarrollo creciente que están teniendo los cultivos y las ciudades, los habitantes

perciben las prácticas de manejo y aplicación de fitosanitarios como un riesgo potencial para su salud y el medio ambiente.

El clima de incertidumbre acerca de los impactos de los agroquímicos a veces se convierte en un conflicto entre agricultores y pobladores de las zonas periurbanas. Se denomina zonas periurbanas a los espacios intermedios y sin delimitación aparente entre lo que se considera campo y lo que se define como ciudad, en los cuales coexisten ambos.

Los cambios de urbanización y desplazamientos de las zonas agrícolas requieren el establecimiento de un marco metodológico que contribuya a la comprensión de los procesos de cambio en los sistemas de producción agropecuaria en zonas periurbanas, y el análisis de sus implicancias y tendencias futuras con fines de planificación sustentable en el tiempo. En este tema, los municipios y/o las intendencias deberían realizar el ejercicio de diagramación

urbana de las respectivas poblaciones y ciudades, a efectos de ajustar consecuentemente la localización actual y futura de los parques industriales y las zonas agrícolas linderas.

Dichos cambios han puesto de manifiesto aquellas prácticas exclusivas del sector agrícola, en la mira de la percepción pública, debido a los accidentes y/o posibles malas prácticas en la aplicación de los agroquímicos, e impulsan la necesidad de mejorar las regulaciones y los controles tanto a nivel provincial como municipal.

La calidad de aplicación de los productos químicos no sólo permite un control y/o manejo eficiente de las adversidades bióticas que afectan la producción (Maccarini 1993), sino que considera de una manera especial a la máquina utilizada, su regulación, las condiciones climáticas al momento de la aplicación y la capacitación del operario, todos estos factores inciden en los procesos de contaminación ambiental y en la salud del operario mismo (Lansón y col. 2009).

Las Buenas Prácticas de Aplicación son un conjunto armónico de técnicas y prácticas aplicables a la distribución de fitosanitarios, tendientes a lograr que el producto pueda expresar su máxima capacidad para la que fue concebido, disminuyendo al máximo cualquiera de las diferentes formas de deriva, evitando así los posibles daños emergentes a la salud y al ambiente (FAO 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Una aplicación de agroquímicos, considerando las propiedades físicas y químicas de la sustancia a utilizar (Piazza y col. 1999), la calidad del vehículo empleado en el caldo, las condiciones climáticas como humedad, temperatura, dirección y velocidad del viento, el equipo de aplicación utilizado y sus componentes, capacitación del operario, tanto sea en aplicaciones aéreas como terrestres, irremediablemente condicionan a un buen resultado (FAO 2003a; FAO 2003b).

Las distintas variables fueron analizadas por los autores, y se considera que la expansión actual de las áreas de siembra de cultivos extensivos (cereales, oleaginosos y forrajeras), conlleva la necesidad de un incremento en el uso de productos fitosanitarios. Además, es necesario y conveniente, contar con disposiciones específicas tendientes a reducir los posibles riesgos derivados de la aplicación y utilización incorrecta de productos fitosanitarios,

cuando dichos cultivos se desarrollan en las inmediaciones de zonas urbanas, suburbanas y centros poblados.

Resulta un hecho que la utilización de cualquier sustancia química, natural o de síntesis (Piazza 2005), puede presentar riesgos para el aplicador, como así también para aquellos que se hallen expuestos a la aplicación, considerando no solamente la toxicidad aguda de los mismos, sino también la toxicidad crónica. Definida esta última como los efectos adversos que ocurren como resultado de dosis repetidas diariamente de la misma sustancia química, o exposición diaria a esa sustancia química, durante la mitad de la vida de una persona (Organización Mundial de la Salud 1958).

CONSIDERACIONES

Frente al vacío de unificación de criterios en lo relativo a la regulación por parte de autoridades nacionales, provinciales y municipales de las pulverizaciones aéreas y terrestres en áreas periurbanas, los autores estimamos oportuno enunciar a modo de colaboración y como sugerencia, algunos conceptos que puedan poner luz en las consideraciones sobre el empleo correcto y responsable de agroquímicos.

Está explícito que la responsabilidad en la aplicación de los agroquímicos es compartida, no solamente por el aplicador, el dueño del campo, el director o asesor técnico y la industria, sino también por las autoridades locales y nacionales en su actividad de reglamentar y controlar (Guía de Uso Responsable de Agroquímicos 2010).

Todos, en su conjunto, tienen el compromiso y el deber de asegurar la correcta técnica de aplicación para evitar posibles efectos de contaminación (Etiennot 2007), no sólo por ellos mismos, sino también por las generaciones futuras.

En la década del 70', la denominación genérica que se asignaba a la distribución de agroquímicos era simplemente "fumigar", luego durante los 80', el concepto era "mojar bien", a partir de los 90' a la fecha, comenzamos a hablar de "cobertura" entendiendo como tal a la cantidad de gotas por centímetro cuadrado en el blanco; "variación del tamaño de gotas (referida a la uniformidad) en la población que conforma la aspersión" (amplitud relativa); "coeficiente de variación de la pulverización" (como medida de la homogeneidad en la distribución de las gotas en el cultivo) y de

la “deriva del fitosanitario” como parámetro indeseable para toda pulverización.

Centrando la atención en este último proceso, “la deriva”, por tratarse del efecto más importante a los fines de la presente consideración en el empleo de agroquímicos en zonas periurbanas, podemos asegurar que los factores que interactúan en dicha manifestación, configuran un escenario complejo, muchas veces poco conocido.

DESARROLLO

Con el objeto de realizar un aporte al conocimiento sobre la posible exposición de la población a los agroquímicos y disminuir sus efectos potenciales, consideraremos los factores climatológicos y técnicos que interactúan en el efecto conocido como deriva.

Todo producto fitosanitario que desvía o deriva su trayectoria de aplicación fuera de su objetivo es un posible contaminante del medio.

Según la Norma ASAE S-572, se denomina deriva, al desplazamiento de la aspersión fuera del blanco, determinado por transporte de masas de aire o por falta de adherencia (American Society of Agricultural Engineers 2004).

Por su parte, la Coalición Nacional de Minimización de la Deriva, de Estados Unidos (National Coalition on Drift Minimization 1997), define a la deriva como “el movimiento de las partículas pulverizadas y vapores fuera del blanco, provocando menor efectividad de control y posible daño a la vegetación susceptible, vida silvestre y a las personas”.

Cuando se habla de deriva, en general, se la asocia con el efecto que origina habitualmente el viento, pero en realidad hay otros tipos de deriva menos visibles, originados por la humedad relativa y la temperatura ambiente. Todos estos factores sumados al tamaño de las gotas asperjadas, tendrán mucho que ver con el aumento o disminución de la deriva.

Existen varios tipos de derivas, originados en causales diferentes, en términos generales podemos considerar:

- Deriva de vapor: asociada a la volatilización directamente relacionada con la presión de vapor, estado físico del producto y temperatura ambiente.
- Deriva de partículas: movimiento de partículas pulverizadas durante y después de la aplicación, asociada al tamaño de gota empleada en la pulverización y a las condiciones ambientales.

A efectos de realizar un más detallado análisis

de los factores intervinientes en el complejo proceso de la deriva, podremos citar según Gil Moya (2003) a tres grupos de factores básicos:

- Factores climáticos.
- Factores físicos y químicos del producto aplicado.
- Factores tecnológicos relacionados con las técnicas de aplicación.

Factores climáticos

Temperatura

La incidencia de la temperatura en el proceso de evaporación de gotas se analizará junto a la humedad relativa del aire más adelante, no obstante, consideraremos además, que altas temperaturas reducen la efectividad de muchos productos y bajan notablemente la persistencia de los mismos, pero en otros, como algunos fosforados, producen vapores, los que originan efectos indeseables de deriva.

La presión de vapor, ligada a la deriva de vapor, se incrementa con el aumento de la temperatura y disminuye cuando desciende la misma en el proceso de volatilización.

Muy ligado a las variaciones de temperatura, pero en un sentido vertical, se debe considerar el proceso denominado de “inversión térmica” (temperaturas más altas a mayores alturas).

Se define la inversión térmica como la situación en la que, contrariamente a lo que sucede normalmente con el gradiente térmico, éste manifiesta un aumento de la temperatura al aumentar la altitud. En este caso, se inhiben los movimientos verticales y se genera una gran estabilidad atmosférica.

Es decir, que este fenómeno se presenta cuando el patrón normal de temperatura en la atmósfera se comporta de forma contraria, manifestando la temperatura un aumento con la altitud.

Este fenómeno climático es totalmente natural y resulta del intercambio de energía calorífica entre la corteza terrestre y las capas de aire de la atmósfera.

El sol calienta el suelo durante el día, al finalizar éste, el suelo comienza a irradiar parte del calor acumulado a la atmósfera. El aumento de energía provocada por tal irradiación sobre las moléculas del aire de las capas más próximas al suelo, genera una corriente de aire ascendente. Si se realiza una aplicación de agroquímico en esas condiciones de estabilidad atmosférica, el asperjado queda suspendido, imposibilitado de descender y ante

la posible presencia de una corriente de aire (viento) puede arrastrar las gotas, si éstas son de pequeño tamaño, fuera de la zona de tratamiento originando molestas derivas.

El proceso de "inversión térmica" puede observarse en la mayor parte de la noche, a primeras y últimas horas del día, generando estabilidad atmosférica limitando las dispersiones. Es muy fácil de observar este efecto en un camino de tierra, cuando al paso de un vehículo, las partículas de tierra quedan en suspensión por un largo espacio de tiempo después del paso del vehículo, o bien, observando una columna de humo, la que al llegar a la zona de inversión térmica deja de ascender y adopta un movimiento horizontal.

Humedad relativa del aire

Es un componente importante en la consideración de las derivas y, además, resulta casi determinante, junto a la temperatura, de la posibilidad o no de realizar una aplicación toda vez que afecta al proceso de evaporación de las gotas del asperjado. Valores de humedad muy bajos, 50% o menos, pueden causar gran evaporación reduciendo el diámetro de las gotas antes que ellas lleguen al blanco.

La temperatura y la humedad son de gran importancia y operan en una reciprocidad muy estrecha, de forma tal que suele contribuir al aspecto más importante y determinante de la evaporación de las gotas que constituyen el asperjado.

La velocidad de evaporación depende: de la humedad relativa, del aumento de la temperatura del aire y de la velocidad del viento.

Es evidente, entonces, que la velocidad de evaporación es máxima cuando la humedad relativa es baja, las temperaturas son elevadas y el viento se manifiesta activamente.

En la *Figura 1* puede observarse la combinación de diferentes temperaturas y humedades relativas, que grafican las posibilidades de realizar las pulverizaciones, tanto terrestres como aéreas. O, por el contrario, cuando las condiciones exigen extremar los cuidados, y es necesario producir cambios en la técnica de aplicación y hasta el extremo de suspender la actividad.

Viento

Importan la intensidad y la dirección del mismo, esta última en relación a las zonas periurbanas o cursos de agua más próximos.

Es sabido que la ausencia total de viento no

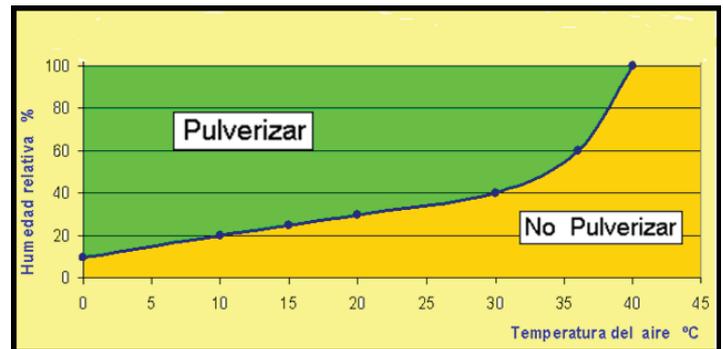


Figura 1. Combinación de temperaturas y humedades para determinar la oportunidad para realizar la pulverización.

es aconsejable al realizar una aplicación pero, por el contrario, tampoco vientos excesivos son apropiados ya que pueden llevar el pulverizado a zonas no apropiadas.

Los análisis anteriormente realizados, eximen de otros comentarios referidos a la gravitación del viento en las aspersiones agrícolas.

Tanto en el empleo de equipos terrestres como aéreos, existe la disponibilidad de técnicas y de agregados al caldo pulverizado, con el fin de reducir los efectos negativos de los vientos con cierta intensidad (Wiles 1994).

Algunos autores (Costa y col. 1997) toman como límite 15 km/hora en general, sin considerar cuestiones agronómicas específicas, pero en este caso podría considerarse como el límite máximo en zonas próximas a urbanizaciones, cuerpos o fuentes de agua y cultivos sensibles, debiendo ser, además, el sentido del viento, contrario a estas zonas sensibles.

Factores físicos y químicos del producto aplicado

Los factores físicos y químicos de cada sustancia, relacionados con su formulación, indican qué distintas medidas se deben tener en cuenta en la aplicación, como es el caso de la tensión superficial, presión de vapor, volatilidad, descomposición, coeficiente de partición, entre otros factores.

Algunos de estos factores se definen como:

- La volatilidad representa la tendencia del fitoterápico a pasar a la fase gaseosa. Todas las sustancias orgánicas son volátiles en algún grado dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura ambiente. La volatilidad se mide a partir de la constante de Henry, la cual depende de la presión de vapor en estado líquido

y de la solubilidad en agua.

- La presión de vapor es una medida de volatilidad de una sustancia química (fitosanitario) en estado puro y es un determinante importante de la velocidad de volatilización al aire desde suelos o cuerpos de agua superficiales contaminados. La presión de vapor se incrementa cuando se aumenta la temperatura y disminuye cuando desciende la temperatura.
- La presión de vapor se expresa usando una variedad de unidades, pascales (Pa), milímetros de mercurio (mm Hg equivalente a Torr), libras por pulgada cuadrada (lb/pulg²) y atmósferas (atm).
- La unidad del sistema internacional de presión de vapor se expresa en pascales (Newton /m²) o en milipascales (10⁻³Pa).
- El coeficiente de partición octanol/agua o coeficiente de partición (Kow), es una constante dependiente de la temperatura y presión. Habitualmente se usa el logaritmo $Kow = \log P$, además de la polaridad de la sustancia y su peso molecular.
- La constante de Henry, establecida en La ley de Henri, que enuncia que, a una temperatura constante, la cantidad de gas disuelta en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ejerce ese gas sobre el líquido.

Por lo expuesto, el grado de conocimiento sobre el producto es otro aspecto importante por considerar. En ese sentido, la lectura de las instrucciones consignadas en las recetas agronómicas y etiquetas adheridas a los envases (SENASA, Resolución 816 2006), por parte de los agricultores y aplicadores esencialmente debería incentivarse, dado que presentan información detallada sobre las características, uso, peligros, medidas preventivas; entre otras características relacionadas con el fitosanitario.

Sin embargo, los agricultores y aplicadores manifiestan que el alto contenido técnico de esas notas, muchas veces resulta ser poco comprensible, en muchos casos por falta de conocimientos técnicos (CASAFE 2009).

Por qué leer la etiqueta:

- Prueba que el producto fitosanitario está legalmente autorizado para su uso.
- Informa acerca del uso seguro, efectivo y legal del producto.
- Identifica los riesgos y qué hacer en caso de emergencia.
- Ayuda al médico en caso de intoxicación.

Cuándo se debe leer la etiqueta:

- Antes de comprar un producto fitosanitario.
- Antes de usar un producto fitosanitario.
- Antes de almacenar un producto fitosanitario.
- Antes de eliminar los envases vacíos.

Es menester establecer un programa de difusión y capacitación permanente para los aplicadores y agricultores que informe y sensibilice sobre los posibles peligros del incorrecto uso de fitosanitarios, tanto para la salud como para el ambiente.

La volatilidad, como factor adicional, representa la tendencia del agroquímico a pasar a la fase gaseosa. Todas las sustancias orgánicas son volátiles en algún grado, dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura ambiente.

Otro factor adicional muy importante a tener en cuenta, son las inadecuadas mezclas de tanques con el objetivo de ampliar los controles, incorporando el "clásico chorrillo" de insecticida a los herbicidas, o las tan comunes mezclas de herbicidas con la incorporación de uno de ellos con alta capacidad de volatilización a efectos de ampliar la eficacia del tratamiento.

Factores tecnológicos

La mayoría de las veces se da mucha importancia, en el manejo de las adversidades, exclusivamente a la materia activa y dosis utilizada, pero muy poca a la técnica de aplicación. La consecuencia es la pérdida de eficacia, cuando no, el fracaso del tratamiento, a la vez que producen el mayor impacto sobre el ambiente (Friedrich 1998)

En la pulverización, se debería producir una aplicación que proporcione una cobertura considerable del blanco (expresada en número de impactos por centímetro cuadrado) y que deposite la cantidad suficiente de producto (respecto de la dosis) para obtener el resultado biológicamente buscado a efectos de manejar correctamente la adversidad (Bogliani y col. 2005).

En este sentido, una adecuada aplicación que asegure la eficiencia biológica del agroquímico requiere un nivel de cobertura que dependerá del tipo de agroquímico a utilizar y de la forma de actuar del mismo.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la aplicación, es el tamaño de las gotas. Desde el punto de vista biológico, gotas de menor tamaño son más eficientes pero, además,

necesarias para optimizar la cobertura lograda sobre el blanco, principalmente cuando se emplean productos que ejercen su acción por contacto (Friedrich 1995).

A medida que aumenta el tamaño de las gotas, disminuye la influencia del viento que provoca deriva, además de evitarse los efectos posibles de evaporación que son mayores cuando menor es el tamaño de las gotas. Es por ese motivo, que las aplicaciones de agroquímicos que ejercen su acción por vía sistémica, pueden ser realizadas con gotas de mayor tamaño (dentro de ciertos límites) que no afectarán la eficiencia de la aplicación a pesar de disminuir la cobertura obtenida (Washington y col. 2005).

Las gotas muy grandes (superiores a 500–600 micrones), al hacer impacto en el blanco, estallan sobre el mismo y se producen, como consecuencia, pérdidas por escorrentías al no poder ser retenidas por el blanco.

La regulación del equipo ejerce una influencia marcada en la deriva, en la medida que influye en el proceso de formación, en el tamaño de las gotas y su uniformidad (Onorato y Tesouro 2006).

En resumen, el tamaño correcto de las gotas constituye un compromiso importante, que el aplicador deberá respetar, para producir una buena cobertura del blanco y un correcto efecto biológico. Se consideran tamaños de gotas de 150/200 a 450 micrones DMV (diámetro volumétrico medio) como las más útiles a estos fines.

Así podremos consignar a manera de sugerencias algunas características según sea el atomizador empleado:

Pastillas y atomizadores

Pastillas de abanico plano

El mercado ofrece, en este tipo de pastillas, diferentes modelos que se adaptan especialmente para realizar una exigente selección por tamaños de gotas requeridas.

Pastillas de semejante flujo, pero de ángulos de aspersión más grande, producen gotas más finas. Así, empleando pastillas de ángulos de 65°, 80° y 110° a igual presión de trabajo e idéntico flujo, van produciendo cada vez gotas más finas. Cuanto mayor la presión de trabajo, de menor tamaño serán las gotas producidas.

Ejemplos de otras pastillas:

Pastillas de abanico plano antideriva o deriva reducida

Son pastillas especialmente diseñadas para evitar la presencia de gotas muy pequeñas.

Normalmente, en las pastillas hidráulicas comunes, la presencia de gotas muy chicas (menores de 100 a 200 micrones) representa del 20 al 40 % del total de gotas emitidas, mientras que en este tipo de boquillas, tan sólo llega a representar del 10 al 17 % del total de gotas. Para lograr esta importante reducción, la pastilla posee un preorificio removible que reduce la presión dentro de la boquilla, logrando así disminuir la generación de gotas tan pequeñas, que son las que cubren el espectro más susceptible de sufrir los efectos de deriva.

Pastillas asistidas por aire

Las pastillas asistidas por aire constituyen un original diseño que permite introducir aire dentro del cuerpo de la pastilla merced a un efecto *venturi*.

Se origina la formación de gotas cuyo diámetro es mayor que el de las formadas convencionalmente pero rellenas de aire de modo que al llegar al blanco estallan originando un elevado número de gotas de diámetros menores.

Pastillas de cono hueco

Cuanto mayor sea el diámetro del “disco difusor”, de mayor tamaño serán las gotas a una misma presión. Así, un “disco difusor” D_2 , producirá gotas más finas que el “disco difusor” D_{10} trabajando a la misma presión.

Asimismo, cuanto mayor el número del “núcleo de turbulencia” mayor será el tamaño de las gotas a la misma presión. Siendo el “núcleo de turbulencia” el que mayor influencia tiene en el tamaño de las gotas producidas. El “núcleo de turbulencia” número 25 tiende a formar gotas pequeñas, el número 45 forma gotas de finas a medias y los “núcleos de turbulencia” número 46 o 56 tienden a formar gotas de medias a grandes, siendo estas tres últimas opciones las preferidas para aplicaciones más críticas en relación a la deriva.

Pastillas CP

Este tipo de pastilla presenta un deflector en la extremidad de la misma, que permite ser colocado en tres posiciones (ángulos) diferentes: 30°, 55° y 90°. La posición que produce las gotas más grandes es la de 30°, evitándose utilizar la posición de 90° cuando el riesgo de deriva es grande.

Atomizadores rotativos

En estos equipos, el tamaño de la gota producido, está directamente relacionado con la velocidad de rotación del mismo. Esta velocidad, a su vez, depende del ajuste del ángulo de las palas y de la velocidad de avance.

Deseando reducir al máximo la deriva, las palas

que accionan al equipo, deben ser colocadas con el mayor ángulo posible (85° en los atomizadores Micronair AU-5000).

A manera de resumen se podría afirmar que cuando la deriva se manifiesta como un factor prioritario a contrarrestar, el ajuste o regulación del equipo aspersor (terrestre o aéreo) debe priorizar la formación de gotas más grandes (300 micrones de DMV).

Otras alternativas

Túnel de viento

Se puede mencionar para equipos de aplicación terrestres la posible adopción del túnel de viento, que es aquel que produce una cortina muy pareja de viento (con velocidad regulable) por detrás de los elementos atomizadores dando lugar a una acción protectora a las gotas evitando así el efecto deriva.

Según Bragachini y col. (2001), es necesario un caudal de aire de 2.000 m³/h por metro de botalón con una velocidad de aire en la salida no menor a los 35 m/seg equivalente a una velocidad de 126 km/h, esto permitiría trabajar a una velocidad de avance de 14 a 15 km/h sin problemas, generando una corriente lo suficientemente potente como para anular la incidencia del viento ambiental y dejar libre el camino a la gota expulsada por acción hidráulica para llegar al objetivo con buena penetración y mínima deriva.

Coadyuvantes antideriva

Los coadyuvantes son productos que se adicionan a los caldos de aspersión con el objetivo de mejorar la actividad de los agroquímicos o facilitar la aplicación a través de la modificación de las características de la solución o el asperjado.

Características y propiedades

Químicamente son polímeros no iónicos o ligeramente aniónicos (poliacrilamida o polioxietileno) que modifican la viscoelasticidad (que es la propiedad que algunas sustancias exhiben, conteniendo ambas características “viscoso y elástico”) al experimentar deformación y por lo tanto la disminución de la frecuencia de gotas sensibles a deriva. Su efecto es proporcional a la concentración agregada.

Se desempeña, además, como agente de anclaje interno de líquidos, confiriéndole propiedades físicas al agua, que acotan el coeficiente de variabilidad de las gotas asperjadas, reduciendo notablemente la formación de microgotas y, por ende, la posibilidad de su desplaza-

miento lateral debido a la acción del viento. Provee también cualidades antievaporantes.

El viento (ya fue considerada su influencia) al aumentar su velocidad, incrementa la probabilidad de que se produzca deriva. Los operadores, tanto de equipos terrestres como aéreos, no pueden controlar el viento, pero pueden variar la fuente de producción de gotas pulverizadas, como se expresara recientemente, a fin de compensar las condiciones ambientales desfavorables. Para esto, es primordial conocer el “potencial de deriva” de los diferentes tipos de pastillas basado en el porcentaje de gotas menores a 150 – 200 micrones DMV. Estos valores son entregados habitualmente por los fabricantes y se pueden encontrar en la bibliografía específica.

Por último, y conforme a lo ya analizado, el tamaño de gota es determinante en gran medida en el manejo de la deriva. (Norma ASAE S-572, Asociación Americana de Ingenieros 2004). El volumen de aplicación en sí, no tiene mayor influencia sobre la misma.

Normalmente, al aumentar el tamaño de las gotas asperjadas para reducir la deriva, se produce consecuentemente, una reducción del número de gotas depositadas por unidad de superficie (gotas/cm²). Si este número de impactos, fuese demasiado bajo, será entonces necesario aumentar el volumen de aplicación (litros/hectárea) para aumentar en la misma proporción el número de gotas/cm² (Pompe y col. 1992).

ESTABLECIMIENTO DE ZONAS BUFFER. DISTANCIAS A CENTROS PERIURBANOS

Es evidente que se ha avanzado en el proceso de calidad de distribución de agroquímicos, incorporando tecnologías que permiten tener un sistema de producción más eficiente y con menor impacto en el medio ambiente (Red de Agricultura Sostenible 2009). A lo largo de los últimos tiempos, indudablemente, las mejoras han sido más evidentes en los aspectos técnicos. Hoy se dispone de elementos y conocimientos tecnológicos que permiten ofrecer mayores garantías de calidad en lo referente a las aplicaciones fitosanitarias y ello se corresponde con la mayor sensibilidad de nuestra sociedad respecto a la seguridad de los consumidores, los trabajadores y el medio ambiente. Hoy, pensar una agricultura libre de uso de agroquímicos resulta muy difícil, independientemente de ello, se deben buscar herramientas alternativas que ofrezcan seguridad en el manejo de los agroquímicos.

Zona buffer

Una zona *buffer*, también conocida como zona de amortiguamiento, está pensada como las superficies adyacentes a determinadas áreas de protección que, por su naturaleza y ubicación, requieren un tratamiento especial para garantizar la conservación del espacio protegido, sin entorpecer las actividades que en ellas se desarrollan (Madrigal y col. 2007).

La instalación de zonas amortiguadoras es una de las soluciones propuestas para eliminar la posibilidad de contaminación de zonas sensibles a los plaguicidas. Los trabajos existentes muestran que las primeras permiten limitar el transporte de agroquímicos hacia las segundas (Valenciano Mora y col. 2003).

La instalación de zonas amortiguadoras es una de las soluciones propuestas para combatir este tipo de contaminación (CORPEN 1997; Patty 1997; Patty y col. 1997).

Así, la experiencia de Bulacio y col. (2005) indica que, partiendo de una aplicación de 125 g/ha de un marcador, a los 100 m de la aplicación se registró una llegada de la aspersión de una cantidad de 0,078 ng (nanogramos) del producto marcador sobre el organismo blanco con un viento algo superior a los 15 km/h.

En el caso de fuentes o cursos de agua, la distancia de aplicación que se aconseja es de 5 m mínimo (Solomon y col. 2009), sin dejar de considerar las propiedades físico-químicas del producto que se utiliza y consultando la etiqueta sobre las medidas de mitigación que indica, en caso de ser necesario.

Sugerencias de distancias a zonas periurbanas

Por lo expuesto, es necesario proponer una recomendación sobre los productos utilizados sin afectar a las personas ni al ambiente (Etiennot y Piazza 2010).

La dimensión de la franja de seguridad, zona *buffer*, se establece de acuerdo con la vulnerabilidad de la zona, presencia de cursos de agua, urbanizaciones, la toxicología del producto aplicado.

Las condiciones meteorológicas (temperatura, humedad y dirección e intensidad de viento), la técnica de aplicación empleada, la dosis de producto fitosanitario aplicada y las características del equipo utilizado (tamaño de gota originado) serán elementos encuadrados dentro de las Buenas Prácticas Agrícolas.

Realizada una exhaustiva revisión de los antecedentes existentes para situaciones similares

a las que se dan en nuestro medio, no habiendo encontrado análisis sistematizados sobre las variables y acciones regladas a adoptar, se enumeran los distintos casos encontrados en los cuales sólo consideran simplemente distancias, como en España (20 a 50 metros), basados en la recopilación de información local del Instituto Nacional de Toxicología (Ministerio de Justicia) y los departamentos comunales de Agricultura (European Crop Protection Association (ECPA) 2009)

En los EEUU, los análisis (hechos con modelos matemáticos) proponen, en general, 10 m de distancia desde la aplicación hasta las viviendas. Existen proyectos para restringir aplicaciones alrededor de áreas públicas, pero no se mencionan distancias (Cordell y Baker 2001; ECPA 2009).

Países desarrollados no tienen fijadas distancias y, en algunos casos, arbitrariamente han establecido distancias de 30 m (Pompe y col. 1992). Experiencias publicadas por Solomon y col. (2009) demuestran que la deriva de la pulverización es mínima y que las zonas de amortiguación (*buffer*) relativamente pequeñas, extendiéndose a partir de 5 a 120 m, protegen a animales acuáticos sensibles y los organismos "no blanco".

En estudios realizados en Alemania (Ganzelmeier y col. 1995) en cultivos planos, en cultivos altos (como vid, frutales, etc.) y en hortalizas, ornamentales y frutales pequeños, se evaluaron distancias desde los 5 m hasta los 50 m, con porcentajes evaluados de residuos de los productos aplicados en hojas jóvenes que fueron desde 20% hasta 0,2%, respectivamente. Estos valores fueron los más altos encontrados en todos los cultivos citados.

En Brasil, el Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (M.A.P. y A.) establece por el art. 10 de la Normativa 002/2008, para las aplicaciones aéreas, una distancia de 500 m de las poblaciones, ciudades, aldeas, fuentes de agua para el abastecimiento de la población; y de 250 m de fuentes de agua aisladas y de rodeos de animales. Además, no establece zona *buffer* alguna para las aplicaciones terrestres (M.A.P.y A., art. 10, 2008).

En Uruguay, el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca por Decreto 264 (Julio 2003) fija restricciones para aplicaciones aéreas: 500 m, y terrestres: 300 m; de cualquier zona urbana o suburbana y centro poblado. Con posterioridad, en febrero 2008 se impone una zona *buffer* a toda pulverización, de 30 m a

fuentes y cursos de agua (Reforma artículo 70, 2003).

En Australia, están evaluando el tema, para aplicar un esquema de producto por producto y según la intensidad del viento (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority 2010).

Mención aparte merecen las reglamentaciones recientes que se están implementando en algunos países europeos destinadas a prevenir la deriva de las aplicaciones fitosanitarias. Durante los últimos años se han desarrollado amplios programas de investigación para conocer a fondo los mecanismos de la deriva y, consecuentemente, poder actuar de forma preventiva. Tanto la industria de maquinaria agrícola, como el sector agroquímico y los centros de investigación han contribuido a que, hoy en día, se disponga de un amplio abanico de posibilidades para ejercer un control de la deriva.

Sugerencias sobre el uso de barreras vivas

Las Cortinas Forestales de protección, conocidas como barreras vivas (Ottone 1993), que se interponen a la dirección del viento con el fin de proteger cultivos, montes, animales, suelos y poblaciones (Müller Defradas 1978), pueden utilizarse a fin de frenar en un alto porcentaje las probables derivas, teniendo en cuenta lo siguiente:

1. Colocar la barrera a una distancia mínima de 50 m del perímetro externo del ejido municipal en cuestión, lo cual además favorece los laboreos como limpieza de malezas y/o hojas caídas, control de roedores y otras plagas.
2. La cortina tiene que ser permeable. Utilizar alternando árboles de hojas caducas con hojas perennes. Deben evitarse las cortinas macizas dado que en el invierno, impiden que el viento circule permitiendo regular las temperaturas bajas.
3. La cortina debe disponerse en tres líneas de especies de distinta magnitud, la línea más próxima a las viviendas deben ser árboles de primera magnitud (2 o más m), la línea intermedia se consideraran especies de segunda magnitud (de 1 a 2 m de altura) y finalmente la última línea estará conformada por especies arbustivas de hasta 1m de altura.
4. Dependiendo de la especie elegida debe respetarse las distancias entre

las plantas, considerando su desarrollo posterior.

5. El ancho mínimo de la barrera viva deberá ser de 5 m.
6. Evitar la utilización de especies que tengan un "desrame" natural (término de uso agronómico que se refiere a la caída natural y/o corte o poda por acción del hombre, de ramas de árboles o arbustos) como en el caso de los eucaliptos, o aquellas que poseen la característica de alelopatía dado que evitan el crecimiento de otros árboles y/o arbustos que conformarían la cortina como es el caso de las casuarinas.
7. Siendo esta barrera formada por seres vivos, se debe implementar no solamente el riego, sino además los cuidados necesarios para mantenerlas en pie, con las posibles reposiciones que pueden necesitarse.

En Paraguay, el Ministerio de Agricultura y Ganadería mediante el Decreto 2048 de Marzo de 2004, reglamenta el uso y manejo de plaguicidas de uso agrícola establecidos en la Ley N° 123/91, y establece la obligatoriedad de uso de las barreras vivas. Inclusive dicho decreto adiciona en su contenido fotografías para su mejor comprensión, donde se muestran gramíneas de alto porte, como las cañas, formando cercos perimetrales (Decreto 2048 2004).

Adoptando la utilización de la cortina forestal, puede reducirse en un 30% la distancia establecida.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Lo expresado hasta aquí exige una información base para priorizar acciones de capacitación, especialmente dirigida a usuarios directos como aplicadores y agricultores, la implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica de población en riesgo por los agroquímicos, como parte de un sistema de gestión de plaguicidas para la adopción por parte de las autoridades sectoriales y municipales de medidas sobre el control del comercio de fitosanitarios y medidas preventivas durante su uso y manipulación de los mismos.

Existe, además, la necesidad de difundir en la sociedad en su conjunto, la seguridad de la utilización de fitosanitarios basada en las evaluaciones de riesgo realizadas por la autoridad de aplicación, como SENASA en nuestro país

(Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Resolución 350 1999).

Se expresa una vez más la necesidad de que el personal asignado a la tarea de realizar las aplicaciones, cuente con la debida capacitación y desarrolle correctamente sus capacidades, en la regulación y calibración de sus equipos, a efectos de minimizar inconvenientes.

Es, en este sentido, que como un aporte meramente orientativo, se deja a consideración de quienes corresponda el siguiente cuadro de distancias a zonas periurbanas desde las aplicaciones (*Tabla 1*), reiterando una vez más, que la responsabilidad de la buena aplicación es compartida, no solamente por el aplicador, el dueño del campo, el director o asesor técnico, la industria, sino también por las autoridades locales y nacionales en su actividad de reglamentar y controlar.

Las distancias se fijaron con respecto a los sistemas de aplicación (tanto terrestre como aérea); a las DL50 de los agroquímicos, siendo la DL50 la cantidad de sustancia, administrada por una vía específica, que se requiere para causar la muerte del 50% de un grupo de animales de experimentación, bajo ciertas condiciones controladas, y se expresa en miligramos de la sustancia (mg) por kilogramos de peso corporal del animal (kg).

Se consideraron las DL50 obtenidas en los estudios de toxicidad aguda oral y dermal del producto agroquímico formulado, según la clasificación de Organización Mundial de la Salud detallada en la *Tabla 2a* y complementada con la *Tabla 2b*. Además, se incorporó para la recomendación del presente trabajo, los resultados de los estudios de irritación ocular y dermal de los agroquímicos según exige y considera la legislación vigente.

Esta clasificación de la Organización Mundial de la Salud se utiliza internacionalmente como las consideraciones a tener en cuenta sobre la salud de los técnicos, productores, etc. que realizan el manipuleo y las aplicaciones de los fitosanitarios, y la misma fue adoptada por SENASA como organismo de control en Argentina como recomendación para los dichos actores.

La ejecución de las Buenas Prácticas Agrícolas (FAO 2003a, Guía Buenas Prácticas Agrícolas de aplicación aérea; FAO 2003b, Guía Buenas Prácticas Agrícolas de aplicación terrestre) conlleva a minimizar los riesgos emergentes de los efectos de toxicidad crónica de los productos utilizados, contemplando el respeto a

Tabla 1. Distancias sugeridas, basadas en la toxicidad aguda oral y en la toxicidad aguda dermal.

| Distancias sugeridas desde el límite de la aplicación al límite de la zona periurbana | Productos a emplear en aplicación TERRESTRE según clase toxicológica | Productos a emplear en aplicación AÉREA según clase toxicológica |
|---|--|--|
| Hasta 100 m | No se sugiere* | No se sugiere* |
| De 100 m hasta 200 m | Productos clase IV | No se sugiere* |
| De 200 m hasta 400 m | Productos clase III y IV | Productos clase IV |
| De 400 hasta 1000 m | Productos clase II, III y IV | Productos clase III y IV |
| De 1000 hasta 1500 m | Sin limitación | Productos clase II, III y IV |
| Más de 1500 m | Sin limitación | Sin limitación |

* A menos que sea necesario otro producto, utilizar los productos clase toxicológica IV, únicamente con la presencia de un Ingeniero Agrónomo matriculado, responsable de la aplicación con autorización expresa del municipio o por la autoridad correspondiente.

Tabla 2a. Clasificación toxicológica según riesgos y valores de DL50 de productos formulados.

| CLASIFICACIÓN DE LA OMS SEGUN LOS RIESGOS | CLASIFICACIÓN DEL PELIGRO | COLOR DE LA BANDA | SÍMBOLO DE PELIGRO | PALABRAS (*) |
|--|---------------------------|-------------------|--------------------|--------------|
| Ia Sumamente peligroso | MUY TÓXICO | Rojo PMS 199 C | Calaveras y tibias | MUY TÓXICO |
| Ib Sumamente peligroso | TÓXICO | Rojo PMS 199 C | Calaveras y tibias | TÓXICO |
| II Moderadamente Peligroso | NOCIVO | PMS Amarillo C | Cruz de San Andrés | NOCIVO |
| III Poco Peligroso | CAUTELADO | Azul PMS 293 C | | CAUTELADO |
| Productos que normalmente no ofrecen peligro | | Verde PMS 374 C | | CAUTELADO |

Información que debe figurar en la etiqueta de un fitosanitario comercializado en Argentina. (*) La palabra debe ubicarse por debajo del símbolo y centrada.

Tabla 2b. DL 50 en ratas (mg/Kg de peso corporal).

| | POR VIA ORAL | | POR VIA CUTANEA | |
|-----|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | Sólido | Líquido | Sólido | Líquido |
| Ia | 5 o menos | 20 o menos | 10 o menos | 40 o menos |
| Ib | > a 5 a 50 | > a 20 a 200 | > a 10 a 100 | > a 40 a 400 |
| II | > a 50 a 500 | > a 200 a 2000 | > a 100 a 1000 | > a 400 a 4000 |
| III | > a 500 a 2000 | > a 2000 a 3000 | > a 1000 | > a 4000 |
| IV | > a 2000 | > a 3000 | | |

la totalidad de los factores y elementos abordados anteriormente.

En particular, y como aclaración respecto a la exposición crónica de los vecinos a las zonas próximas de aplicación de los agroquímicos, ésta no es significativa, ya que según se define la toxicidad crónica, requiere de una exposición prolongada y continúa al mismo producto, contrariamente a las prácticas agronómicas que se realizan comúnmente. De existir necesidad de conocer la información con respecto a la toxicidad crónica de los productos, ésta se encuentra desarrollada en las hojas de seguridad de cada fitosanitario y tomando en cuenta su concentración en el formulado.

El cumplimiento en forma estricta de las Buenas Prácticas Agrícolas (FAO 2002) minimizaría sensiblemente estos riesgos, al igual que aquellos generados por el incumplimiento de los períodos de carencia con respecto a los límites máximos de residuos.

No se ha tomado en cuenta para establecer las distancias, la toxicidad inhalatoria, dado que este trabajo se corresponde con las aplicaciones que se realizan a campo, sin poder extrapolar parámetros que relacionan concentración, saturación y otros, en áreas abiertas. Tampoco se consideraron las propiedades físico-químicas de los productos empleados, ni la tecnología de aplicación utilizada o el clima, todos factores analizados anteriormente. Inclusive, las recomendaciones realizadas no contemplan barreras como cortinas forestales circundantes a las zonas urbanizadas, pero sí consideran viviendas de uso permanente.

Debido a la complejidad de los temas abordados, se hace dificultoso proponer soluciones ambientales estandarizadas.

Finalmente, con motivo de facilitar no solamente la aplicación en forma responsable de los fitosanitarios en estas zonas en análisis, sino también a modo de sugerencia general, se establece que todas las aplicaciones deben contar con la presencia de un Ingeniero Agrónomo matriculado para verificar los factores que se detallaron y analizaron a lo largo del presente trabajo.

Se reitera, que este aporte es puramente orientativo y se realiza a efectos de facilitar un análisis más completo y fundado sobre las Buenas Prácticas Agrícolas, respetando lo expresado en cuanto a los factores a considerar dentro de las Buenas Prácticas de Aplicación y sin considerar la toxicidad crónica.

Además, debe considerarse utilizar productos

no irritantes dérmicos ni oculares desde 100 hasta 200 m, a partir de esa distancia no existen restricciones con respecto a la irritabilidad.

Con respecto a las aplicaciones con equipos manuales, como mochila de espalda, no es de esperar normalmente derivas, debido a que esta forma de trabajo la aplicación es dirigida directamente al objetivo, por lo que no sería necesario considerar las recomendaciones establecidas para el resto de las aplicaciones. Pero, ante cualquier duda, corresponde aplicar los conceptos vertidos en este trabajo, tanto para las prácticas agronómicas tradicionales como en la producción orgánica.

En la producción orgánica, no se permite la utilización de productos de síntesis o elaborados por el hombre, pero algunas de las sustancias permitidas en dicha producción poseen una alta toxicidad, riesgosa para la salud como los preparados a base de nicotina (posee cientos de cancerígenos naturales) o de la raíz de *Ryania speciosa*, los mismos son productos permitidos para la Producción Orgánica (Secretaría Agricultura, Ganadería y Pesca, Resolución n° 423/1992. Anexo B).

Las recomendaciones expuestas, deben tenerse en cuenta para los tratamientos que se realicen dentro de la zona urbana y periurbana tanto en huertas familiares, jardines, parques o superficies afines, como en las aplicaciones de "domisanitarios", denominación para los productos utilizados en el control de plagas urbanas, como por ejemplo control de mosquitos o de vinchucas. Éstos últimos productos conllevan las mismas consideraciones, ya que, en muchos casos, las únicas diferencias entre los productos para el agro y para la salud pública son la marca comercial, el destino para el cual se utilizan y el organismo regulador que, en este caso, es el Ministerio de Salud, pero no existen diferencias entre sí en cuanto a su toxicidad.

La diferencia realizada en la comparación entre las aplicaciones terrestres y las aplicaciones aéreas, solamente se basa en la "percepción pública" dado el desconocimiento popular que considera de mayor riesgo una versus otra, sin fundamentos y siendo cualquiera de las dos aplicaciones técnicamente iguales, cuya única variación es la "herramienta" que se utiliza.

BIBLIOGRAFIA CITADA

American Society of Agricultural Engineers, Norma ASAE S572, Spray Nozzle Classification by Droplet Spectra. Feb 2004.

Association of Food and Drugs Officials of the United States, Appraisal of Safety of Chemicals in Foods and Cosmetic. USA. 1965.

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. [en línea]. New registration application and label requirement in relation to spray drift management. [consulta julio de 2010]. Operational Notice, Australian Government. Australia. Marzo 2010. Disponible en: http://www.apvma.gov.au/registration/morag/notices/docs/op_notice_spray_drift.pdf.

Bogliani M., Hilbert J., Tesouro O., Masia G., Venturelli L., Bulacio L. Aplicar eficientemente los agroquímicos, Rosario: Ediciones INTA. 2005.

Bragachini M., Méndez A., von Martini A. Mercado de Pulverizadoras II - Pulverizadoras Autopropulsadas. Eslabonamiento Productivo del Sector Maquinaria Agrícola Argentina, Consejo Federal de Inversiones. Argentina. Mayo 2001.

Bulacio L., Sarubbi C., Panelo M.S., Etiennot A.E. Pastillas pulverizadoras: Análisis de deriva. En: Aplicar eficientemente los agroquímicos. Rosario: Ediciones INTA; 2005. p. 56-60.

Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), Guía de Productos Fitosanitarios, 14^a Ed. Buenos Aires. 2009. Tomo 1. p 1-500.

Cordell S., Baker P. Pesticide drift. Cooperative Extension. The University of Arizona. College of Agriculture. Tucson. 2001.

CORPEN. Produits Phytosanitaires et Dispositifs Enherbés. État des Connaissances et Propositions de Mise en Ouvre. CORPEN. Ingeniería, investigación y tecnología. *Versión impresa* ISSN 1405-7743. París, Francia 1997.

Costa J.J., Margheritis A.E., Marsico O. Introducción a la Terapéutica Vegetal. Ed. Hemisferio Sur. Primera reimpresión. Argentina. 1997.

Decreto 2.048/04 por el cual se deroga el decreto n° 13.861/96 y se reglamenta el uso y

manejo de plaguicidas de uso agrícola establecidos en la ley N° 123/91[en línea]. Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2004. República del Paraguay. [actualizado en marzo de 2004, consulta julio de 2010]. Disponible en: http://www.senave.gov.py/docs/decretos/Decreto%20N%C2%BA%202.048_04.pdf.

Etiennot A., Piazza A. Bases técnicas para establecer medidas de manejo para minimizar la exposición a productos fitosanitarios. Distancias de aplicación alrededor de zonas pobladas. Trabajo presentado en el III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC), Santa Fe, 12 al 14 de mayo, 2010.

Etiennot A.E. Técnica de aplicación de fitoterápicos. En Ficha Nro 5. Sistemas de aplicación. Terapéutica Vegetal. Dto. de Tecnología. Universidad Nacional de Luján. Argentina. 2007.

European Crop Protection Association (ECPA). Overview Report. Legal requirements and provisions in the different Member States with a view to the implementation of the Sustainable Use Framework Directive. USA. Mayo 2009.

Food and Agriculture Organization (FAO). Guías sobre Buenas Prácticas para la Aplicación Aérea de Plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma, Italia. 2003a.

Food and Agriculture Organization (FAO). Guías sobre Buenas Prácticas para la Aplicación Terrestre de Plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 2003b.

Food and Agriculture Organization (FAO). Manual de Buenas Prácticas Agrícolas, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO Eds. Roma. 2002.

Friedrich T. Food and Agriculture Organization (FAO). Agricultural Engineering Branch, Agricultural pesticide application. Concepts for Improvements. FAO Eds., Roma. 1995.

Friedrich T. La actuación de la FAO con respecto a la tecnología de aplicación para agroquímicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). FAO Eds. Italia. 1998.

Ganzelmeier H., Rautman D., Spangenberg R., Streloke M., Herrmann M., Wenzelburger H. Studies on the spray drift of plant protection products. Results of a test program carried out throughout the federal Republic of Germany. Berlín, Alemania. 1995.

Gil Moya A.E., Tratamientos en viña. Equipos y técnicas de aplicación. Ediciones UPC, S.L. Barcelona. 2003.

Guía de Uso Responsable de Agroquímicos (GURA) [en línea]. Ministerio de Salud, Argentina. 2010. [consulta julio de 2010]. Disponible en <http://www.msal.gov.ar/agroquimicos/descargas/nuevos/GURA2010.pdf>.

Lanson D.E., Schein L., Miglioranza M. Aportes para la Compresión de la Incidencia de los Factores Climáticos y Tecnológicos sobre la Deriva de Agroquímicos Aplicados a Cultivos de Soja y sus Respectivos Efectos sobre la Población Potencialmente Expuesta. Argentina. 2009.

Maccarini L. Técnicas de Control Fitosanitario. Tomo I. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 1993.

Madrigal M., Benoit P., Barriuso E., Real B., Duestre A., Moquet M. Retención de plaguicidas en zonas amortiguadoras. Caso del isoproturon. *Ing. Invest. y Tecnol.* 2007;8(1):35-43.

Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento. Normativa 002/2008, art. 10. Brasil. 2008.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Reforma al artículo 70 del Decreto Ejecutivo n° 31520. Reglamento para las actividades de Aviación Agrícola n°34.202. República Oriental del Uruguay. 2003.

Müller Defradas R. Las Mejoras. Las plantaciones y reparos permanentes. En: *Técnica de la Organización de Estancias*. Capítulo 2. Editorial Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1978;25-27.

National Coalition on Drift Minimization. Association of American Pesticide Control Officials (AAPCO). Pesticide Drift Enforcement Policy. USA. 1997.

Onorato A., Tesouro O. Pulverizaciones Agrícolas Terrestres. Ediciones INTA. Castelar. 2006.

Organización Mundial de la Salud (OMS), Métodos de Ensayos Toxicológicos de los Aditivos Alimentarios [en línea]. Serie de Informes Técnicos, número 144. [consulta julio de 2010]. OMS, Ginebra, Suiza. 1958. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_144_spa.pdf.

Ottone J.R. Árboles Forestales, prácticas de cultivo. Editorial Agro Vet. Buenos Aires. 1993.

Patty L. Limitation du Transfert par Ruissellement vers les Eaux Superficielles de Deux Herbicides (Isoproturon et Diflufenicanil). Tesis de doctorado de la Universidad Joseph-Fourier de Grenoble. 1997.

Patty L., Real B., Gril J. The use of Grassed Buffer Strips to Remove Pesticides, Nitrate and Soluble Phosphorus Compounds from Runoff Water. *Pestic Sci.* 1997;49(3):243-251.

Piazza A. Los Agroquímicos Que Comemos. 1ra edición. Dunken, Buenos Aires, Argentina. 2005.

Piazza A., Pérez Lissarrague J., Barbado J.L. Guía Práctica para el Profesional en Fitoterápicos. Dunken, Buenos Aires, Argentina. 1999.

Pompe J.C.A.M., Holterman H.J., Van Straelen B.C.P.M. Technical aspects of pesticide application. A literature review. *IMAG-DLO Rapport (Netherlands)*. 1992;91-11.

Red de Agricultura Sostenible (RAS). Norma para Agricultura Sostenible [en línea]. Anexo I: Distancias entre áreas de producción y ecosistemas terrestres, ecosistemas acuáticos y áreas de actividad humana. [consulta: julio 2010]. San José de Costa Rica. 2009. Disponible en: <http://www.fiitgt.com/images/descargas/RAS%20Norma%20para%20Agricultura%20Sostenible%20Abril%202009.pdf>.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Manual de Procedimientos, Criterios y Alcances para el Registro de Productos fitosanitarios en la República Argentina.

Resolución SAGPyA n° 350/1999. República Argentina.1999.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Productos permitidos para el control de plagas y enfermedades. Resolución SAGyP n° 423/92. Anexo B: República Argentina.1992.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Normas para el Etiquetado de los Productos Fitosanitarios Formulados de Uso Agrícola [en línea]. Resolución n° 816/2006, SENASA. [actualizado al 21/11/2006; consulta: julio 2010]. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1029&io=5020>.

Solomon K.R., Marshall E.J.P., Carrasquilla G. Human Health and Environmental Risks from the Use of Glyphosate Formulations to Control the Production of Coca in Colombia: Overview and Conclusions. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 2009;72(15-16):914-920.

Valenciano Mora R., Laprade Coto S., Fournier Leiva A., Trejos Obando E. Manejo de la deriva en las aplicaciones aéreas de fungicidas en fincas que poseen zonas de amortiguamiento. [en línea]. Reforma al artículo 70 del Decreto Ejecutivo N°31520-MS-MAG-MOPT-MGSP, Reglamento para las actividades de Aviación Agrícola, del 16 de octubre del 2003. [consulta: julio de 2010] Disponible en: http://www.pgr.go.cr/scij/scripts/TextoCompleto.dll?Texto&nNorma=62128&nVersion=70786&nTamanoLetra=10&strWebNormativa=http://www.pgr.go.cr/scij/&strODBC=DSN=SCIJ_NRM;UID=sa;PWD=scij;DATABASE=SCIJ_NRM;&strServidor=\\pgr04&strUnidad=D:&strJavaScript=NO.

Washington J.R., Gauhl F., Valenciano R., Fournier A. Aplicaciones Aéreas y Deriva en el Cultivo de Banano en Costa Rica. 2005.

Wiles T. Pesticide Application Equipment in Latin America; Report FAO/AGSE, Roma, Italia. 1994.

DETERMINAÇÃO DE METAIS CLASSIFICADOS COMO DE IMPORTÂNCIA TOXICOLÓGICA NO MOLUSCO BIVALVE *Anadara notabilis* (Röding, 1798) ENCONTRADO EM GALINHOS, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL

Urbano de Araújo, Marcos A.*; Vitória de Moura, Maria F.; Borges de Carvalho, Genickson.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Laboratório de Química Analítica Aplicada, Departamento de Química, CEP: 59078-970, Natal RN, Brasil.

*Autor responsável: marcosaraujonet@yahoo.com.br

Recibido: 22 de octubre de 2010

Aceptado: 4 de diciembre de 2010

Resumo: DETERMINAÇÃO DE METAIS CLASSIFICADOS COMO DE IMPORTÂNCIA TOXICOLÓGICA NO MOLUSCO BIVALVE *Anadara notabilis* (Röding, 1798) ENCONTRADO EM GALINHOS, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL. Antonio Marcos Urbano de Araújo; Maria de Fátima Vitória de Moura; Genickson Borges de Carvalho. *Acta Toxicol. Argent. 2010 18 (2): 54-58*. Os moluscos bivalves são consumidos por todo o mundo, constituindo-se em um recurso natural de boa aceitação pela população. Foi escolhido o molusco *Anadara notabilis* (conhecido como Xibiu ou Búzio) para este trabalho pelo seu tamanho característico, bem maior que os mariscos mais comuns, e também por não ter sido encontrado na literatura nenhuma informação toxicológica sobre esta classe de moluscos. Todos os íons metálicos foram determinados por espectroscopia de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) descrito pela metodologia U.S. EPA 6010C. Os resultados mostraram que estiveram presentes no molusco vários metais de caráter tóxico, porém apenas o cromo obteve valor acima do permitido pela legislação brasileira. Dentre os metais classificados como tóxicos o cobre que apresentou valor de 5,7 mg/Kg, o níquel que apresentou teor de 4,23 mg/Kg e o cromo, o único acima dos valores permitidos pela legislação brasileira, com teor de 1,7 mg/Kg, sempre considerando a amostra *in natura*. Como os moluscos têm a propriedade de acumular metais em seu organismo, para o consumo desse tipo de alimento, deve-se tomar cuidado com as áreas próximas de sua coleta ou se cultivado, é necessário prevenir fatores que influenciem em sua contaminação.

Palavras chave: Moluscos; *Anadara notabilis*; Metais; Espectroscopia de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado.

Abstract: DETERMINATION OF METALS OF TOXICOLOGICAL IMPORTANCE IN THE BIVALVE *Anadara notabilis* (Röding, 1798) OF GALINHOS, COAST OF RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL. Antonio Marcos Urbano de Araújo; Maria de Fátima Vitória de Moura; Genickson Borges de Carvalho. *Acta Toxicol. Argent. 2010 18 (2): 54-58*. Bivalve molluscs are consumed throughout the world, constituting a natural resource with good acceptance by the population. The mollusc *Anadara notabilis* (know as eared ark) was chosen for this study due to its characteristic size, much larger than most common shellfish, and the lack of toxicological information found in literature for this class of mollusks when considering metal ions toxicity. Metal ions were measured by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), method described by U.S. EPA 6010C. Results showed that several toxic metals were present in shellfish, however only chrome was measured in levels higher than those allowed by Brazilian legislation. Among those classified as toxic metals, copper showed a value of 5.7 mg / kg, nickel of 4.23 mg / kg and chromium of 1.7 mg / kg, when considering whole shellfish samples. As molluscs are able to accumulate metals in their body, for its consumption care should be taken regarding the areas in close proximity to their collection or cultivation, including prevention of factors that influence contamination.

Keywords: Molluscs; *Anadara notabilis*; Metals; Optical emission spectroscopy inductively coupled plasma.

INTRODUÇÃO

Os ambientes marinhos e costeiros do Brasil sofrem constantemente vários processos de degradação ambiental, gerado pela crescente busca por recursos naturais marinhos e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem tais tipos de impactos. A alteração ou destruição de *habitats*, como alterações na sedimentação causada pela poluição industrial, por exemplo, constitui nos maiores impactos ambientais nas zonas costeiras brasileira,

especialmente em regiões próximas aos grandes centros. Inúmeras baías e estuários estão sofrendo com a poluição oriunda da exploração de recursos minerais, comprometendo assim os *habitats* marinhos. (Marins *et al.* 2004). Os moluscos bivalves são seres invertebrados, filtradores e com ampla distribuição ao longo de praias e de estuários. Através da filtragem da água que passa pelo local onde vivem, esses animais retêm pequenas partículas e microorganismos que lhes servem de alimento.

O lançamento de resíduos ou dejetos em rios ou mares, mesmo em quantidades reduzidas, pode causar uma lenta acumulação de íons metálicos nesses seres e uma consequente biomagnificação. (Carvalho 2006).

O gênero *Anadara* é encontrado ao redor do mundo em diversas espécies como *Anadara granosa*, *Anadara senilis*, *Anadara antiquata*, *Anadara trapézia* e *Anadara notabilis*. Essas espécies são encontradas na Ásia, África, Oceania e América do Sul. Essa classe de moluscos é destacada pelo seu tamanho, medindo em média 10 cm quando se trata de um indivíduo adulto, sendo bem maior que os moluscos encontrados em varias regiões, por exemplo, a *Anomalocardia brasiliiana* e os mexilhões que medem aproximadamente 3 a 4 cm. No Brasil, particularmente em Galinhos, município do Rio Grande do Norte, é encontrado uma população de *Anadaras notabilis*. (Dam *et al.* 1993, 1994). Esse molusco, além de consumido, tem sua carapaça utilizada por artesões na costa Potiguar, sugerindo uma forma de despertar interesse pelo manejo sustentável dessa espécie, o que torna seu emprego nesta região uma fonte de renda.

Além do seu grande valor nutricional, os moluscos bivalves também são utilizados como monitores biológicos. As ostras, mexilhões e outros bivalves têm sido utilizados com sucesso como bioindicadores da presença de contaminantes, incluindo os metais traços, em ambientes aquáticos (Chagas-Spinelli *et al.* 2006).

Os moluscos bivalves também são amplamente usados na avaliação de íons metálicos em ambiente aquáticos, por fornecerem informações exatas e integradas sobre o impacto ambiental e biodisponibilidade de tais elementos (Guimarães & Sígolo 2008).

A determinação de baixas concentrações de metais e metalóides requer uma utilização de técnicas suficientemente sensíveis e versáteis. A fim de satisfazer essas necessidades, a espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) pode ser utilizada, por apresentar boa sensibilidade, fazer medições precisas e exatas, proporcionando baixos limites de detecção. Essas características são essenciais para obtenção de resultados satisfatórios em determinações analíticas (Petry 2005 & Skoog 2005).

O objetivo deste trabalho é caracterizar o molusco *A. notabilis*, a respeito dos metais de caráter toxicológico e comparar os teores apresentados com os valores permitidos pela legislação.

METODOLOGIA

Os métodos utilizados nesta pesquisa seguem os métodos oficiais realizados de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz 2005).

Preparo das amostras:

As amostras foram coletadas por uma equipe de biólogos, acondicionados em sacos plásticos e colocadas dentro de um recipiente térmico de isopor, coberto com gelo para manter a integridade das amostras.

No laboratório, foi feita a limpeza parcial de cada amostra com água destilada, retirando os organismos e sujeiras, (areia, folhagens, etc.), que ficaram aderidos à superfície da carapaça das amostras e que poderiam interferir nos resultados das análises. Após essa limpeza, os espécimes foram medidos e pesados um a um para o conhecimento das dimensões e peso, *Tabela 1*, em seguida foram abertos para retirada do seu tecido mole que constitui a amostra propriamente dita.

Tabela 1. Medidas de tamanho e peso médio dos espécimes de *A. notabilis*.

| Tamanho / cm | Peso / g |
|-----------------|----------------|
| 7,67 (0,84)* | 147,1 (18,05)* |
| * desvio padrão | |

Após a retirada do tecido mole das amostras, elas seguiram em alíquotas de 10,0 g para estufa a fim de retirar toda sua umidade. Esse procedimento foi realizado utilizando uma estufa de ventilação forçada de ar modelo QUMIS/Q-314M243, em que a amostra passou cerca de 12 horas sob temperatura controlada a 105°C. Foi realizado a cada 3 horas até a obtenção de peso constante, o que garante toda perda da umidade. Após essa desumidificação, as amostras foram trituradas. Após a trituração foram pesadas três alíquotas de 5,0 g e transferidas para cadinhos de porcelana. Em seguida foram incineradas no bico de Bunsen. Após esse procedimento, levou-se a um forno tipo mufla modelo EDG3P-S a 550°C para o processo de calcinação. Decorrido 4 horas do processo as cinzas obtidas através da calcinação foram dissolvidas em HNO₃ (10%) e filtradas para balões volumétricos de 50 mL, feito isto às soluções foram guardadas em frascos de plástico e rotuladas para leitura.

Medidas através do ICP-OES:

As soluções foram levadas para a leitura de metais por espectroscopia de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), através do equipamento modelo iCAP 6300 Duo da Thermo, para obtenção dos teores de íons metálicos em estudo. A Tabela 2 mostra as condições de operação do equipamento.

Tabela 2. Condições de operação do ICP-OES.

| Parâmetros | Condições |
|------------------------|-------------------------|
| Potência do plasma | 1150 W |
| Gás refrigerante | 4,0 L m ⁻¹ |
| Gás auxiliar | 0,5 L min ⁻¹ |
| Visão | Axial |
| Nebulizador | V-Groove |
| Pressão do nebulizador | 0,16 µPa |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mundialmente existem organizações para controlar alguns alimentos quanto à presença de contaminantes inorgânicos, metais ou não metais dentre essas podemos citar a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e como nacional a Associação Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA (ANVISA 1998).

A Portaria n°. 685/98 de 27 de agosto de 1998 do Ministério da Saúde, publicado no Diário Oficial da União em 28/08/98 aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos" complementa e fazem algumas modificações no Decreto Lei n° 55.871 de 26 de março de 1965 (ANVISA 1998), porém este Decreto não faz referência a todos os metais de caráter toxicológico, o que impossibilita uma comparação total com os resultados obtidos.

Os metais classificados como de importância toxicológica presentes na *A. notabilis* foram determinados por espectroscopia de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), a Tabela 3 apresenta esses resultados referentes às médias das análises feitas em triplicata para as duas coletas.

Tabela 3. Teores dos metais classificados como de importância toxicológica apresentados no molusco *A. notabilis*. Média para as duas coletas feitas em triplicata em mg/Kg () desvio padrão, LM – limite máximo, AIN – amostra in natura, AS – amostra seca. * Não existe limites para estes metais de acordo com a ANVISA.

| Metais | Teor _{AIN} | Teor _{AS} | LM |
|-------------------|---------------------|--------------------|-----|
| Alumínio | 30,88 (5,125) | 148,4 (24,62) | * |
| Bário | 0,151 (0,013) | 0,731 (0,066) | * |
| Boro | 3,810 (0,999) | 18,31 (4,803) | * |
| Cádmio | 0,502 (0,064) | 2,395 (0,310) | 1,0 |
| Chumbo | 0,200 (0,006) | 0,943 (0,030) | 2,0 |
| Cobre | 5,711 (0,467) | 27,45 (2,248) | 30 |
| Cromo | 0,170 (0,029) | 0,813 (0,142) | 0,1 |
| Estrôncio | 4,142 (0,738) | 19,91 (3,546) | * |
| Lítio | 2,733 (2,111) | 13,13 (10,14) | * |
| Manganês | 1,520 (0,198) | 7,310 (0,953) | * |
| Molibdênio | 0,080 (0,021) | 0,400 (0,102) | * |
| Níquel | 4,231 (0,281) | 20,33 (1,350) | 5,0 |
| Titânio | 0,311 (0,041) | 1,475 (0,201) | * |
| Vanádio | 0,062 (0,017) | 0,300 (0,085) | * |
| Zinco | 12,31 (0,782) | 59,16 (3,758) | 50 |

O teor de alumínio foi de 30,88 mg/Kg para amostra *in natura* e 148,4 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de bário foi de 0,151 mg/Kg para amostra *in natura* e 0,731 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de boro foi de 3,810 mg/Kg para amostra *in natura* e 18,31 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de cádmio foi de 0,502 mg/Kg para amostra *in natura* e 2,395 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de chumbo foi de 0,200 mg/Kg para amostra *in natura* e 0,943 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de cobre foi de 5,711 mg/Kg para amostra *in natura* e 27,45 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de cromo foi de 0,170 mg/Kg para amostra *in natura* e 0,813 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de estrôncio foi de 4,142 mg/Kg para amostra *in natura* e 19,91 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de lítio foi de 2,733 mg/Kg para amostra *in natura* e 13,13 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de manganês foi de 1,520 mg/Kg para amostra *in natura* e 7,310 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de molibdênio foi de 0,080 mg/Kg para amostra *in natura* e 0,400 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor

de níquel foi de 4,231 mg/Kg para amostra *in natura* e 20,33 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de titânio foi de 0,311 mg/Kg para amostra *in natura* e 1,475 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de vanádio foi de 0,062 mg/Kg para amostra *in natura* e 0,300 mg/Kg considerando a amostra seca. O teor de zinco foi de 12,31 mg/Kg para amostra *in natura* e 59,16 mg/Kg considerando a amostra seca.

Não foi encontrada na literatura nenhuma informação sobre metais de interesse toxicológicos no molusco em estudo, então se comparou os resultados obtidos com os valores determinados por Queiroz de Brito (2010), que analisou alumínio em moluscos *Mytella falcata* na Cidade de Galinhos RN, e obteve um teor de 68 mg/Kg em relação a amostra *in natura*, sendo mais que o dobro do valor encontrado para *A. notabilis*, este alto valor pode ser explicado pela idade dos moluscos coletados por Queiroz de Brito terem idade mais adulta quando comparado com as *A. notabilis*. Emerenciano *et al.* (2009) determinaram metais no molusco *Anomalocardia brasiliiana* encontrada no Rio Potengi, Natal/RN, e obteve os seguintes teores para os metais: chumbo 1,0 mg/Kg considerando a amostra *in natura*, cerca de cinco vezes mais que os determinados em nossa análise, esse alto valor deve ao fato do Rio Potengi ser alvo de contaminação por metais. Com relação ao o cobre o teor presente na *A. brasiliiana* foi de 1,7 mg/Kg o teor presente na *A. notabilis* ficou bem acima desse valor. Um fator que pode explicar esse alto valor para o cobre é a carcinicultura que existe próximo a área de coleta das nossas amostras. Lacerda *et al.* (2009) mostram que áreas próximas ao cultivo de camarão são enriquecidas de cobre liberado pelo manejo dos viveiros. Chen (2001) destaca a toxicidade do sulfato de cobre presente na ração administrada durante a alimentação dos viveiros de camarão. O cromo presente na *A. brasiliiana* apresentou teor de 0,5 mg/Kg bem acima do valor encontrado na *A. notabilis*. Já o níquel presente na *A. brasiliiana* teve teor de 0,7 mg/Kg, o teor encontrado em nossa amostra foi bem maior, uma hipótese para este valor pode ser explicado pela indústria petrolífera que existe na próximo a área de coleta, esse problema também foi relacionado por Furtado (2007). Segundo Cardoso Cavaco e Bodstein de Barros (2005) as águas de produção provenientes da exploração de petróleo, contém quantidades variadas

de sais e gases dissolvidos, bem como partículas sólidas e até gotículas de óleo suspensas ou emulsificadas na água. Além disso, a água ainda apresenta um aumento no teor de metais, dentre eles o níquel. O teor de zinco apresentado na *A. brasiliiana* ficou bem abaixo do valor encontrado em nossas amostras cerca de 1,7 mg/Kg. Apesar de ser considerado como micronutrientes os metais Cu, Cr, Mn, Mo, Ni, V e Zn, podem se apresentar como agentes contaminantes dependendo dos níveis de concentração, por isso estes metais estão incluídos em metais de interesse toxicológicos. Somente o Cr, de acordo com o Decreto nº 55871 apresentou-se um pouco acima do valor permitido. De acordo com GOMES *et al.* (2005) o Cr³⁺ não é a forma mais tóxica encontrada, porém esta forma é tóxica ao organismo quando ingerida em dosagens extremamente elevadas. Contudo, os graves problemas relacionados à intoxicação com cromo se referem ao Cr⁶⁺, que, normalmente, é inalado em ambientes industriais e pode causar ulceração do septo nasal, inflamação da mucosa nasal, bronquite crônica e enfiseima. Para alguns metais, o decreto não estabelece valores limites.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram determinados os teores de metais de interesse toxicológico: Al, Ba, B, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Li, V, Ti e Zn presente molusco *Anadara notabilis*. A determinação desses teores é muito importante para segurança dos consumidores desse tipo de alimento, principalmente para as comunidades litorâneas que utilizam essas espécies em sua dieta, como também no controle de qualidade, considerando o interesse tecnológico do processamento para fins diversos (farinha, rações), fornecendo assim informações toxicológicas necessárias para uma segurança do produto. Com relação aos metais classificados como de importância toxicológica, o cromo apresentou um teor um pouco acima do permitido. Para os demais metais analisados nenhum outro esteve acima dos valores tolerados considerando a legislação local para amostra *in natura*. Este trabalho ressalta que para a criação e ou consumo de espécies como as aqui estudadas é imprescindível uma caracterização do local para verificar a influência de alguns fatores que possam causar a contaminação dos mesmos, tendo em vista as espécies acumularem íons metálicos durante a vida.

BIBLIOGRAFIA CITADA

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 685, de 27 de agosto de 1998. [Acesso em 05 maio 2010]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm>.

Cardoso Cavaco P.C., Bodstein de Barros, A. Gestão de efluentes e recursos hídricos em campos de produção de petróleo terrestres. [em linea] In: II Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia, SEGeT, 2005, São Paulo SP. [Acesso em 24 dez. 2009]. Disponível em: http://www.aedb.br/seget/artigos05/378_GESTAO%20DE%20EFLUENTES%20P%20Cavaco.pdf.

Carvalho R.M. Determinação de íons metálicos em moluscos bivalves do manguezal da região petrolífera de São Francisco do Conde Recôncavo Baiano, Campinas. 181 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil. 2006.

Chagas-Spinelli A.C., Costa M.F., Lima E.S. Avaliação de métodos de métodos de preservação de tecidos moles de moluscos bivalves para análise geoquímica e uso como bioindicadores de contaminação ambiental: Caso do estuário de Barra de Jangadas, nordeste do Brasil. Estudos Geológicos. 2006;16 (2):67-82.

Chen J., Lin C. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. 2001;192(1):55-65.

Dam T.K., Bandyopadhyay P., Sarkar M., Ghosal J., Bhattacharya A., Choudhury A. Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. Biochemical and Biophysical Res Commun. 1994;203(1):36-45.

Dam T.K., Sarkar M., Ghosal J., Choudhury A. Purification and partial characterization of a N-glycolylneuraminic acid specific lectin from the clam *Anadara granosa* (L). Biochem Biophys Res Commun. 1993;196(1):422-9.

Emerenciano D.P., Silva H.F., Carvalho G.C., Cruz A.M. F., Da Moura M. Análise da ocorrência de metais: bário, cádmio, chumbo, cobre,

cromo, estanho, níquel e zinco, em mexilhão (*Anomalocardia brasiliensis*) coletados no Estuário Potengi/Jundiá, RN. Publica. 2009;4(2).

Furtado J.G.C. Estudo de impactos ambientais causados por metais pesados em água do mar na Baía de São Marcos: Correlações e níveis. 74f. Dissertação (mestrado em química). Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil; 2007.

Gomes M.R., Rogero M.M., Tirapgui J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. Rev Brás Méd Esporte. 2005;11(5).

Guimarães V., Sígolo J.G. Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbicula fluminea*): Rio Ribeira de Iguape, SP. Química nova. 2008;31(7):1696-1698.

Instituto Adolfo L. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 4ta. Ed. São Paulo, Brasil. 2005.

Lacerda L.D., Santos J.A., Lopes D.V. Fate of copper in intensive shrimp farms: bioaccumulation and deposition in pond sediments.. Braz J Biol. 2009;3(69):851-858.

Marins R.V., Paula Filho F.J. de, Maia S.R.R. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. Química Nova. 2004;27(5):763-770.

Petry C.F. Determinação de elementos traços em amostras ambientais por ICP/OES. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS, Porto Alegre, RS, Brasil; 2005.

Queiroz De Brito G. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado aliada a quimiometria na determinação de íons metálicos no molusco *Mytella falcata* para discriminação de estuários potiguares. 167 f. Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil. 2010.

Skoog D. Fundamentos de química analítica. 8ª Ed. São Paulo, Brasil. Ed. Thomson Parainfo. 2005.

ADENDA

Los siguientes resúmenes no llegaron a publicarse en el suplemento 18 de septiembre de 2010 de Acta Toxicológica Argentina.

METALES PESADOS EN MANÍ

Badini, Raúl Gerardo

CEPROCOR. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Pabellón Ceprococ, Santa María de Punilla. CP 5164. Córdoba.

La evaluación de la presencia de elementos químicos potencialmente tóxicos en alimentos es de singular relevancia y comparable al menos a la de establecer el valor nutricional del mismo. La disponibilidad de metodologías sensibles capaces de establecer la presencia de elementos tóxicos es ventajosa ya que permite aportar información relevante a la salud pública y asegurar la calidad de un producto alimenticio desde el punto de vista de su inocuidad. El maní (*Arachis hypogaea*) al igual que otras plantas puede absorber y acumular potenciales contaminantes del suelo y del agua. Desde el año 2001 se ha obtenido información nutricional y de presencia de metales pesados en maní de Córdoba, principal provincia productora de Argentina. El maní de origen argentino esta caracterizado por su bajo contenido de

Cd y otros metales pesados y esto significa una ventaja competitiva en su valor de mercado. El conocimiento de los niveles medios es información estratégica para el productor y para la prevención de riesgos de salud. En esta presentación se mostrarán detalles de las técnicas experimentales utilizadas en la determinación de metales pesados y otros elementos considerados no esenciales para muestras de maní argentino. Además, se discutirán los valores máximos encontrados para elementos no esenciales en muestras representativas. Los resultados muestran que la situación de este producto es ventajosa con respecto al encontrado en otros países productores, tanto desde el punto de vista de los nutrientes mayoritarios como desde el bajo impacto de los potencialmente tóxicos.

IDENTIFICACIÓN DE UN COMPUESTO VOLÁTIL CO-DETECTADO EN LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLEMIA, MEDIANTE HEADSPACE-CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (HS-GC-FID) Y SU POSIBLE EMPLEO COMO INDICADOR OBJETIVO DE PUTREFACCIÓN

Identification of a volatile compound co-detected in the blood alcohol determination by Headspace-Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (HS-GC-FID) and its possible use as an objective indication of putrefaction

Oderiz, Nicolás F.; Fernandez Gener, Martín B.; Nieto, Rodolfo R.; Garrote, Irma V.; Mirson, Daniel J.E.

Suprema Corte de Justicia de la Prov. de Bs. As. Dirección Gral. de Asesorías Periciales. Laboratorio de Toxicología y Química Legal. Calle 41 y 119 (1900), La Plata. Tel: (0221)4106410.
daniel.mirson@pjba.gov.ar

Introducción: el etanol puede producirse o degradarse en el cuerpo después de la muerte y esto siempre ocasiona un dilema en el momento de interpretar las concentraciones de etanol en sangre en muestras post-mortem.

Los productos de putrefacción además del etanol incluyen otros compuestos por ejemplo n-propanol, n-butanol, acetaldehído, ácidos grasos y sus esterés, aminas, y algunos gases.

En la presente investigación se analiza la presencia de un compuesto no identificado, detectado por Headspace-Cromatografía Gaseosa con Detector de Ionización de Llama (HS-GC-FID) y su relación con la putrefacción.

Materiales y métodos: se detectó un pico desconocido en las determinaciones de alcoholemia, utilizando la técnica de headspace calentando a 60°C 20 minutos y empleando CO₃K₂ como agente liberador, realizando el análisis por GC-FID. Sobre algunas de estas muestras que presentaban este pico de interés, se aplicó la misma técnica de headspace para la preparación de la muestra y luego fueron analizadas empleando la técnica de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS).

Resultados y discusión: mediante el análisis por GC-MS se identificó la presencia en las

muestras analizadas de trimetilamina, identificada a través de la búsqueda en la biblioteca de espectros de masa NIST.

La trimetilamina es una de las sustancias generadas durante el proceso de putrefacción, situación descrita ampliamente en bibliografía, por lo que resulta un valioso indicador de su desarrollo en las muestras de sangre y, a diferencia de otras sustancias que también son generadas durante este proceso, sus características fisicoquímicas y concentración en la que se encuentra en estas muestras, permite una fácil detección empleando HS-GC-FID, a diferencia de otros compuestos, que aunque son los suficientemente volátiles para ser detectados mediante esta técnica, debido a su baja concentración en las muestras a analizar, su detección no resulta tan sencilla.

DISTRIBUCIÓN DE ARSÉNICO EN CULTIVOS DE *NOSTOC MINUTUM*

Arsenic distribution in *Nostoc minutum* cultures

Ferrari, S.G.¹; Silva, P.G.¹; Navoni, J.A.³; González, D.M.² y Silva H.J.¹

¹Area de Microbiología. ²Toxicología y Qca. Legal. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. 5700 - San Luis.

TE 02652423789 int.127. ³Toxicología y Qca Legal. Universidad de Buenos Aires.

dgonza@unsl.edu.ar

Se realizó el crecimiento de *Nostoc minutum* durante 16 días utilizando dos medios de cultivos alternativos: BW₃ y Watanabe, que fueron suplementados con 1000 mg/L de As(V) y comparados con un cultivo control sin arsénico adicionado. En ambos medios de cultivo *N. minutum* fue estimulado por As(V), siendo el estímulo en medio BW₃ (28,46%) mayor que en Watanabe (12,88%). Se evaluó la capacidad de bioacumulación cuantificando As en biomasa final de *N. minutum* previa mineralización y en el sobrenadante, por HG-AAS. Se observó una bioacumulación de 40,1 mg/g en biomasa de *N. minutum* desarrollado en medio BW₃ con una fracción no determinada de 9,4% mientras que, en medio Watanabe, *N. minutum* bioacumuló 3,14 mg/g de arsénico en biomasa con un 16,4% no determinado.

En ambos casos la fracción no determinada correspondió a la diferencia entre el contenido de As inicial y la sumatoria de arsénico en sobrenadante y biomasa, y podría estar indicando la formación de compuestos volátiles. Efectos estimulatorios de As(V) similares al observado en cultivos de *N. minutum* a 1000 mg/L han sido descriptos para *Phormidium sp.* con una magnitud aún mayor, pudiendo esta elevada tolerancia ser adquirida en ambientes naturales como resultado de la exposición a elevadas concentraciones del metaloide. Los valores de acumulación resultantes están en concordancia con el hallado para *Nostoc sp* a partir de concentraciones de As(V) de 1000 mg/L siendo de 50mg/g. Se concluye que *N. minutum* al crecer en ambientes contaminados podría retener As por bioacumulación y biovolatilización actuando como remediador.

INTOXICACIÓN CON GABAPENTIN: REPORTE DE UN CASO

Gabapentin poisoning: a case report

Di Nardo, Victoria; Trapassi, J.H.; Cortez, Analía; Traverso, C.; Gómez, M.E.; Grau, G.A.; Damín, Carlos.

Hospital General de Agudos Juan A. Fernandez. Cerviño 3356 Buenos Aires, Argentina (1425) 4828-2655.

toxico_fernandez@yahoo.com

Gabapentin es un derivado del GABA aprobado como tratamiento complementario de las crisis parciales (secundariamente generalizadas o no) y dolor neuropático. También se utiliza como tratamiento en el trastorno por estrés postraumático, trastornos de conducta, del humor, bruxismo y profilaxis de migraña. Caso: de paciente de 45 años sexo femenino, que ingresa por deterioro del sensorio, secundario a ingesta intencional de gabapentin y benzodiazepinas en dosis desconocidas, con fines suicidas. Tiempo de latencia: 5 horas. Como antecedentes presenta trastorno depresivo mayor medicada con sertralina. Al ingreso se constató: hipoxemia, deterioro del sensorio, pupilas isocóricas e hiporreactivas, hipoventilación generalizada. Se realizó screening de drogas en orina con resultado positivo para benzodiazepinas. Se instauró tratamiento con oxigenoterapia, lavado gástrico (negativo) y carbón activado en única dosis. Evolucionó con requerimiento de asistencia respiratoria mecánica (ARM) y rabiomólisis, por lo que se

realizó tratamiento con cristaloides. Luego de 48 hs se retiró ARM y se extubó sin complicaciones; presentó mejoría de los valores de CPK sin deterioro de la función renal. Evolucionó con neumonía aspirativa, que respondió favorablemente al tratamiento antibiótico instaurado, y sin secuelas neurológicas.

En estudios con muestras pequeñas (n=20) se han observado signos de toxicidad mínima con dosis de 50 mg a 35 gr. La somnolencia, letargo, hipotensión y vértigos eran los resultados más frecuentes dentro de las 5 hs. El coma fue reportado después de recibir una dosis única de gabapentin. Con el uso terapéutico puede observarse hipoventilación e insuficiencia respiratoria, con grados variables de alteración del sensorio; siendo más frecuente en las sobredosis.

Conclusión: resaltamos la importancia de sospechar este tipo de intoxicación en pacientes con síndromes sedativo hipnótico que evolucionan al coma independiente de la cantidad ingerida, con screening de drogas en orina negativo.

INTOXICACIÓN CON GLICOLES: REPORTE DE UN CASO

Glycols poisoning: a case report

Cortez, Analía; Trapassi, J.H.; Di Nardo, Victoria; Traverso, C.; Gómez, M.E.; Montenegro, M.; Cortese, Silvia.; Damín, Carlos.

Hospital General de Agudos Juan A. Fernandez. Cerviño 3356 Buenos Aires, Argentina (1425). 4828-2655.

toxico_fernandez@yahoo.com

Desde 1930, el etilenglicol ha sido utilizado en una variedad de productos industriales. La vía de exposición más frecuente es la oral, en circunstancias domiciliarias. Las manifestaciones clínicas abarcan desde casos asintomáticos hasta coma con fallo renal y colapso cardiovascular, siendo los metabolitos de los glicoles los principales responsables. La toxicidad sistémica y la muerte, han sido documentadas en exposiciones orales. Presentamos un caso de intoxicación poco frecuente en nuestro medio. Paciente de 42 años, sexo

femenino, que ingresó a guardia 72 hs luego de haber ingerido en forma intencional un trago (30-40 ml aproximadamente) de líquido para frenos (marca Wagner Lockheed-Dot 3 con mezcla de 90 % glicoles), presentando bradipsiquia, desorientación, leve ataxia, astenia y adinamia. Antecedentes de hepatitis C y B, trastorno psicótico no especificado y alcoholismo crónico en tratamiento psiquiátrico con clotiapina, lorazepam, fluoxetina y biperideno. Se constató hemodinámicamente estable, en oliguria con posterior anuria, creatinina: 5,4

mg/dl, urea: 79 mg/dl. hipokalemia, acidosis metabólica con anión gap aumentado: pH: 7,19, HCO₃: 11, anión gap: 31. No se realizó GAP osmolar por falta de osmómetro en el hospital; no se detectaron cristales de oxalato de calcio en orina.

Presentó deterioro del sensorio y pasó a terapia intensiva con mayor deterioro de la función renal, requiriendo asistencia respiratoria mecánica y hemodiálisis. La investigación en plasma de etilenglicol, dietilenglicol y metabolitos 72 hs después de la ingesta, resultó negativa. Se realizó hemodiálisis durante 40 días con mejoría de la función renal y recuperación del ritmo diurético. Se realizó punción biopsia con diagnóstico de necrosis tubular aguda,

tubulitis, tubulorrexia y microcalcificaciones intersticiales. Audiometría con hipoacusia neurosensorial bilateral y simétrica. Ecografía abdominal que informó riñones de tamaño conservado y ecogenicidad aumentada.

Evolucionó con insuficiencia renal crónica, quedando bajo tratamiento médico de la misma, e hipoacusia. Se internó en Hospital Psiquiátrico para tratamiento de su patología mental.

Conclusión: es importante tener un alto índice de sospecha en el diagnóstico de intoxicación con glicoles, ya que su tratamiento oportuno conlleva a una menor mortalidad y mejor pronóstico de las complicaciones renales y neurológicas.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y MORFOMÉTRICOS DE LA TRÍADA MADRE-PLACENTA-FETO EN LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS: ESTUDIO PROSPECTIVO

Biochemical and morphometric parameters of the mother-placenta-fetus triad in pesticide environmental exposition: prospective study

Cecchi Amalia³; Álvarez Gabriel^{2,4}; Bertone María C⁴; Sabino Guillermo^{1,5}; Rovedatti María G¹; Magnarelli Gladis^{1,4}

¹LIBIQUIMA (IDEPA-CONICET), UNComahue. Buenos Aires 1400. Neuquén (8300), Argentina. Tel/Fax: 0299-4490385. ²Hospital C. Rendón. Neuquén. ³Hospital Accame. Allen, Río Negro. ⁴Facultad de Cs. Médicas y ⁵Facultad de Economía, UNComahue. ggmagnarelli@yahoo.com.ar

Considerando que la salud perinatal representa un problema relevante de salud pública, este trabajo se centró en la exposición ambiental a plaguicidas en el Alto Valle del Río Negro, donde los organofosforados (OP) se utilizan intensivamente. El objetivo fue identificar, en la población expuesta, modificaciones en biomarcadores de respuesta en el compartimiento materno, y en parámetros morfométricos del neonato y la placenta, reconocidos indicadores del desarrollo intrauterino. Se realizó un estudio prospectivo con embarazadas utilizándose criterios de inclusión/exclusión. Se determinaron colinesterasas y parámetros bioquímicos en sangre de residentes en comunidades rurales (PoR) en período de receso (PR) (n=50), período de pulverizaciones (PP) (n=47) y en grupo control (PoC) (n=20). Se registraron parámetros morfométricos del neonato y la

placenta en PoC (n=113) y PoR (141). Considerados los factores de confusión, el biomonitorio indicó que la PoR presentó exposición a OP en PP y aumento significativo en los niveles de la transaminasa glutámico oxalacética (P<0,01) y cortisol en PP (P<0,05). El peso de la placenta resultó mayor en PoR que en PoC (P<0,01). La talla, y el perímetro cefálico del neonato, ajustados por sexo y edad gestacional, fueron menores en PoR (P<0,10) y el índice ponderal mayor (P<0,01). Estas alteraciones se traducirían en consecuencias adversas para la salud a corto y largo plazo y evidencian la necesidad de acciones de prevención.

Agradecimientos: Personal del Servicio de Laboratorio y Estadística, Hospital Accame, Allen, Río Negro; Hospital C Rendón, Neuquén. Subsidios de Universidad Nacional del Comahue y SECyT. Becas Carrillo Oñativia, Ministerio de Salud de la Nación.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra, desde el año 2007, el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través de SciELO Argentina.

Acta Toxicológica Argentina tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, resúmenes de tesis, cartas al editor y noticias.

Los artículos originales son trabajos de investigación completos y deben presentarse respetando las siguientes secciones: Introducción; Materiales y métodos; Resultados y Discusión (que pueden integrar una sección conjunta).

Los reportes de casos son descripciones de casos clínicos que por sus características signifiquen un aporte importante a la Toxicología.

Las comunicaciones breves son trabajos de menor extensión pero con connotación toxicológica novedosa y que signifiquen un aporte al campo toxicológico.

Las revisiones o actualizaciones comprenden trabajos en los cuales se ha realizado una amplia y completa revisión de un tema importante y/o de gran interés actual en los diferentes campos de la toxicología.

Los artículos de divulgación y artículos especiales son comentarios de diversos temas de interés toxicológico.

Las notas técnicas son descripciones breves de técnicas analíticas o dispositivos nuevos avalados por trabajos experimentales concluyentes.

Los resúmenes de tesis: son resúmenes ampliados que describen tesis de Maestría o Doctorales aprobadas. Estas deben incluir copia de la aprobación de la tesis con la declaración jurada del autor y su director. El texto no debe superar los 1000 caracteres.

Acta Toxicológica Argentina (en adelante *Acta*), publicará contribuciones en español, portugués y/o inglés. Todas serán evaluadas por al menos dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo de los editores. Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cam-

bios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. La identidad de autores y revisores se mantendrá en forma confidencial.

Envío de manuscritos

Los manuscritos se pueden remitir por vía electrónica a: envios.acta.ATA@gmail.com o en CD-ROM por correo postal a: Alsina 1441, oficina 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

En el caso de envío electrónico indicar en el asunto: "manuscrito para *Acta*" y en el cuerpo del mensaje indicar el título del trabajo y los nombres y apellidos de todos los autores. Adjuntar el manuscrito (archivo de Word 2003 o superior) redactado según las instrucciones para los autores que se detallan más abajo.

Junto con el envío del manuscrito se deberá enviar una carta al Director en formato Word, con el nombre de todos los autores solicitando la consideración del artículo para su publicación. En la carta deberá constar claramente que:

- El trabajo remitido no ha sido publicado en ningún medio y no será enviado a otra revista científica o a cualquier otra forma de publicación, mientras dure la evaluación en *Acta*.
- Todos los autores son responsables del contenido del artículo.
- Todos los autores manifiestan si hubo o no, conflicto de intereses. De haber financiación externa, aclarar cuál fue la fuente. Asimismo, señalar si uno o más de los autores tiene alguna relación con la compañía comercial cuyo producto/s fueron empleados o son mencionados en el estudio realizado.
- En caso que el artículo sea publicado, todos los autores ceden los derechos de autor al *Acta*.

No se podrá iniciar el proceso editorial si la carta no contiene todos los puntos señalados.

Aspectos generales en la preparación del manuscrito para artículo original.

Los manuscritos deberán redactarse con procesador de texto (Microsoft Word versión 2003 o superior), a doble espacio (incluso los resúmenes, referencias y tablas) con un tamaño

mínimo de letra Arial en 12 puntos. Las páginas deberán numerarse desde la portada. Las letras en negrita o itálica se usarán sólo cuando corresponda.

En la primera página se indicará: título del trabajo (mayúscula), nombres y apellidos completos de todos los autores; lugar de trabajo (nombre de la institución y dirección postal); de haber autores con distintos lugares de trabajo se colocarán superíndices numéricos -no encerrados entre paréntesis- junto a los nombres, de manera de identificar a cada autor con su respectivo lugar de trabajo; fax y/o correo electrónico del autor responsable de la correspondencia (que se indicará con un asterisco en posición de superíndice ubicado junto al nombre).

En la segunda página se incluirá el título en inglés y el resumen en el idioma del artículo y en inglés, seguido cada uno de ellos de una lista de cuatro palabras clave, en el idioma correspondiente. Si el trabajo estuviese escrito en inglés, deberá tener un resumen en español. Las palabras clave iniciarán con mayúscula e irán separadas por punto y coma.

Introducción. Incluirá antecedentes actualizados acerca del tema en cuestión y los objetivos del trabajo definidos con claridad.

Materiales y métodos. Contendrá la descripción de los métodos, aparatos, reactivos y procedimientos utilizados, con el detalle suficiente para permitir la reproducción de los experimentos.

Consideraciones éticas. En todos los estudios clínicos se deberá especificar el nombre del Comité de Ética e Investigación que aprobó el estudio y que se contó con el consentimiento escrito de los pacientes. En todos los estudios con organismos no humanos, se deberán especificar los lineamientos éticos con respecto al manejo de los mismos durante la realización del trabajo.

Análisis estadístico. Se deberán informar las pruebas estadísticas con detalle suficiente como para que los datos puedan ser verificados por otros investigadores y fundamentar el empleo de cada una de ellas. Si se utilizó un programa estadístico para procesar los datos, éste deberá ser mencionado en esta sección.

Resultados. Se presentarán a través de una de las siguientes formas: en el texto, o mediante tabla/s y/o figura/s. Se evitarán repeticiones y se destacarán sólo los datos importantes. Se dejará para la sección Discusión la interpretación más extensa.

Las **tablas** se presentarán en hoja aparte,

numeradas consecutivamente con números arábigos, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán los bordes de las columnas. Asegúrese que cada tabla sea citada en el texto. Las **figuras** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los gráficos de barras, tortas o estadísticas deberán tener formato GIF. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán ser incluidas en el texto de la leyenda.

Las **fotografías** deberán ser realizadas en blanco y negro, con buen contraste, en papel brillante y con una calidad suficiente (mínimo 300 dpi) para asegurar una buena reproducción. Los dibujos originales o las fotografías tendrán al dorso los nombres de los autores y el número de orden escritos con lápiz.

Las fotos para la versión electrónica deberán ser realizadas en el formato JPEG o GIF, con alta resolución. Tanto las figuras como las fotografías deberán ser legibles. El tamaño mínimo será media carta, es decir, 21 x 15 cm, a 300 dpi. En todos los casos se deberá indicar la magnificación utilizada (barra o aumento).

Los epígrafes de las figuras se presentarán exclusivamente en una hoja aparte, ordenadas numéricamente y deberán expresar específicamente lo que se muestra en la figura.

Abreviaturas. Se utilizarán únicamente abreviaturas normalizadas. Se evitarán las abreviaturas en el título y en el resumen. Cuando en el texto se emplee por primera vez una abreviatura, ésta irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Unidades de medida. Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se deberán expresar en unidades métricas (metro, kilogramo, litro) o sus múltiplos decimales.

Las temperaturas se facilitarán en grados Celsius y las presiones arteriales en milímetros de mercurio.

Todos los valores de parámetros hematológicos y bioquímicos se presentarán en unidades del sistema métrico decimal, de acuerdo con el

Sistema Internacional de Unidades (SI). No obstante, los editores podrán solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores añadan unidades alternativas o distintas de las del SI.

Nomenclatura. 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 itálica.

Discusión. Se hará énfasis sobre los aspectos del estudio más importantes y novedosos y se interpretarán los datos experimentales en relación con lo ya publicado. Se indicarán las conclusiones a las que se arribó, evitando la reiteración de datos y conceptos ya vertidos en secciones anteriores.

Agradecimientos. Deberán presentarse en letra Arial con un tamaño de 10 puntos y en un sólo párrafo.

Bibliografía. Las citas bibliográficas se señalarán en el texto mediante el apellido del/los autor/es (hasta dos autores) y el año de publicación todo entre paréntesis, separados por punto y coma en el caso de más de una cita, empezando por la cita más antigua a la más actual. En el caso de más de dos autores se señalará el apellido del primer autor seguido de y col. y el año de la publicación.

Ejemplos:

“La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es la sustancia psicoactiva más consumida en el mundo (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999)”.

“El consenso general es que sería deseable que la ingesta total de cafeína durante el embarazo no supere los 300 mg/día (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot y col. 2003)”.

Las referencias bibliográficas completas se incluirán al final del manuscrito bajo el título de Bibliografía Citada, en orden alfabético, con el nombre de todos los autores en cada caso.

Ejemplos:

1. Artículo estándar en publicación periódica Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L.

Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-287.

2. Libros y monografías
Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A.. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

3. Capítulo de libro
Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

4. Material electrónico
a. Artículo en publicación periódica en internet Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [en línea]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponible en: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>

b. Página en internet Cancer-Pain.org [en línea]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [actualizado al 16 de Mayo de 2002; consulta 9 de Julio de 2002]. Disponible en: <http://www.cancer-pain.org/>.

c. Parte de una página de internet American Medical Association [en línea]. Chicago: The Association; c1995-2002 [actualizado al 23 de Agosto de 2001; consulta 12 de Agosto de 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Disponible en: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Para la correcta citación de posibles referencias bibliográficas que pudiesen no citarse en este instructivo, consultar el estilo propuesto por el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas en “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals disponible en: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) is the official publication for scientific promotion of the *Asociación Toxicológica Argentina*. It is a member of the *Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas* (Basic Core of Argentinean Scientific Journals) since 2007. Full articles can be accessed through SciELO Argentina electronic library.

The goal of *Acta Toxicológica Argentina* is to publish articles concerning all areas of Toxicology, including original articles, case reports, short communications, revisions, popularization of science articles, technical notes, thesis summaries, letters to the editor and relevant news.

Original articles must detail complete research and should be organized into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion (the last two can be combined into one section).

Case reports include description of clinical case studies which represent a contribution to the field of Toxicology.

Short communications are brief, concise articles that contribute to the respective area of Toxicology.

Revisions or updates comprise studies where an extensive revision of a topic of current importance and/or interest has been carried out.

Articles concerned with popular science and special articles can comment on a broad range of toxicological topics.

Technical notes should briefly describe new devices or analytical techniques validated by conclusive experimental studies.

Thesis summaries are sufficiently detailed abstracts of approved doctoral or magisterial thesis. They must include a copy of acceptance and a sworn statement by the author and director, and should not exceed 1,000 characters.

Articles can be submitted to *Acta Toxicológica Argentina* (henceforth *Acta*) in Spanish, Portuguese or English. All submissions will be evaluated by at least two independent reviewers, selected by the editors. The Editorial board will base its decision to reject, accept with changes or accept for publication the submitted article on these reviews. The identity of authors and reviewers will not be disclosed throughout this process.

Submission of manuscripts

Manuscripts can be submitted in electronic

form by the e-mail address to: envios.acta.ATA@gmail.com, or sent in CD-ROM to the postal address: Alsina 1441, office 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

For electronic submissions, please include "Manuscript for *Acta*" in the subject. The body of the e-mail should contain the title of the article, as well as the first and last name of all authors. Articles must be attached as Microsoft Word 2003 files or higher, and be in accordance to the guide for authors specified below.

A letter to the Director in Word format in the name of all authors requesting the article be considered for publication also needs to be included. This letter should clearly state that:

- The submitted article has not been published, is not under consideration for publication elsewhere, and will not be sent to another journal or published in any way until the reviewing process in *Acta* concludes.
- All authors are responsible for the content of the article.
- All authors express whether any conflict of interest arose from the study. If they received external funding, the source should be declared. Likewise, any association between authors and commercial companies whose product/s were used or mentioned in the study must be stated.
- If the article is accepted for publication, all authors agree to transfer copyright to *Acta*.

If one or more of these items are not addressed in the letter the editorial process cannot be initiated.

General guidelines in the preparation of manuscripts for original articles

Articles must be written using a word processor (Microsoft Word 2003 or higher) with double-spacing throughout (including abstract, references and tables), and a minimum letter size of Arial 12. Manuscripts must contain page numbers on each page from the first page. The use of bold and italic letters must be limited to the bare minimum necessary.

First page should contain the article title (in capital letters), full name and affiliations of all

authors, workplace (name of institution and postal address; if it differs between authors, numerical superscripts, not in parentheses, next to each author should be used to identify it); fax and/or e-mail address of the corresponding author (signaled by a subscript asterisk next to the name).

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submission and in English, each followed by four key words in the corresponding language. If the article is written in English, then the abstract in Spanish must be provided. Keywords must be headed by capital letters and separated by semicolons.

Introduction. It should include updated background references and clearly stated study goals.

Materials and methods. This section should describe the methods, devices, reagents and procedures used, sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Ethical considerations. All clinical studies must specify the name of the Ethics and Research Committee responsible for the approval of the study, as well as the patients' written consent. Studies involving non human experimental subjects must give assurance that ethical guidelines for the protection of animal handling and welfare were followed.

Statistical analysis. The statistical tests employed should be properly explained and justified to allow verification by other researchers. If statistical software was used to process data, it should be mentioned.

Results can be showed through one of the following formats: text, tables or figures. Authors should avoid repetition, and only the relevant data should be presented. An extensive interpretation of the results should be left for the Discussion section.

Tables must be typed in separate pages and numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Legends or explanations should be included as footnotes. Marks for footnotes must be superscript Arabic numerals in parentheses. Continuous lines may be only used for the outer borders of the first and last row and to separate columns and data titles, not for outer borders of columns. Please make sure that each table is cited in the text.

Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals and presented in separate pages. Drawings must be of good enough quality to ensure adequate reproduction. Bar,

pie or statistical charts must be prepared in GIF format. Numbers, letters and signs within figures must be of the appropriate size to be legible when the final sizing takes place. All signs used must have a reference in the figure caption.

Black-and-white only **photographs** should have proper contrast and a minimum resolution of 300 dpi. Submit all original drawings and photographs in glossy paper with the authors' name and figure number written in pencil in the back. For the electronic submission, photographs should be in high resolution JPEG or GIF formats. Both figures and photographs must be clearly legible. The minimum size for figures is half-letter paper size (21 x 15 cm) at 300 dpi. Magnification must be indicated whether by a scale bar or the magnification number.

Present figure captions in a separate page, accordingly numbered. Only the elements visible in the corresponding figure must be included in the caption.

Abbreviations. Authors should only use conventional abbreviations, avoiding their use in the title and abstract. When an abbreviation is first introduced in the text it must be preceded by the full term, except in the case of unit measures.

Unit measures. Length, size, weight and volume measures should be expressed according to the metric system (meter, kilogram, liter or their decimal multiples). Temperatures will be provided in degrees Celsius; blood pressure in millimeters of mercury.

All hematological and biochemical parameters should follow the metric system, according to the International System of Units (SI). However, editors could require that alternate units be provided before publication.

Nomenclature. For chemicals, authors should primarily adhere to IUPAC norms. Designate organism names according to international norms by stating the unabbreviated genus and species in italic.

Discussion. Emphasis should be placed on the most relevant and novel aspects of the study. Interpret experimental data in terms of previous published findings. Include conclusions without repeating data and concepts stated elsewhere.

Acknowledgements. Limit to a single paragraph, using Arial 10 lettering.

References. Citations in the text consist of the authors' last name (up to two authors) and the year of publication in parentheses. In the case

of more than one citation, list them from the oldest to the newest and separate citations by semicolons. For more than two authors, only cite the first author's last name followed by *et al.* and the year of publication.

Examples:

"Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is the psychoactive substance with the largest consumption worldwide (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999)".

"During pregnancy the total consumption of caffeine should not exceed 300 mg/day (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser and Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)".

Full references must be listed alphabetically at the end of the manuscript under the subheading References.

Examples:

1. Standard article in periodical publications.
Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-7.
2. Books and monographs.
Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.
3. Book chapters.
Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M.

Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B., Kinzler K.W., editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. P. 93-113.

4. Electronic material.

a. Article published in an online journal.
Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [on line]. 2002 Jun. [accessed August 12, 2002];102(6):[1 p.]. Available at: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>Article

b. Website. [Cancer-Pain.org](http://www.cancer-pain.org) [online]. New York: Association of Cancer On line Resources, Inc.; c2000-01[updated May 16, 2002; accessed July 9, 2002]. Available at: <http://www.cancer-pain.org/>.

c. Partial website. American Medical Association [online]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated August 23, 2001; accessed August 12, 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Available at: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

For correct citation please refer to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" proposed by the International Committee of Medical Journals Directors, available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) é o órgão oficial de difusão científica da Associação Toxicológica Argentina. Engloba o Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas, tem acesso a artigos e textos completos através da SciELO Argentina. *Acta Toxicológica Argentina* tem como objetivo a publicação de trabalhos relacionados com diferentes áreas da Toxicologia, em artigos originais, relatos de casos, comunicações breves, atualizações ou revisões, artigos de divulgação, resumos da tese, notas técnicas, cartas ao editor e notícias.

Os artigos originais são trabalhos de pesquisa completos e devem ser apresentados respeitando as seguintes seções: Introdução; Materiais e métodos; Resultados e Discussão (que podem integrar uma seção anexa).

Os relatos de casos são descrições de casos clínicos que tenham em suas características um significado ou aporte importante à Toxicologia.

As comunicações curtas são trabalhos de menor extensão, mas com conotação toxicológica inovadora e que aporte ao campo toxicológico.

Resumos de tese: Resumos ampliados que descrevem teses de Mestrado e Doutorado aprovadas. Estas devem incluir cópia da aprovação da tese com a declaração juramentada do autor e seu orientador. O texto não deve superar 1000 palavras.

As revisões ou atualizações compreendem trabalhos nos quais se tenha realizado uma ampla e completa revisão de um tema importante e/ou de grande interesse atual nos diferentes campos da toxicologia.

Os artigos de divulgação e artigos especiais são comentários de diversos temas de interesse toxicológico.

As notas técnicas são descrições breves de técnicas analíticas ou dispositivos novos ou apoiados por trabalhos experimentais conclusivos.

Acta Toxicológica Argentina (em adiante *Acta*) publicará contribuições em espanhol, português e/ou inglês. Todas serão avaliadas por pelo menos dois revisores; a seleção dos mesmos será atributo exclusivo dos editores. Este processo determinará que o mencionado Comitê opte por rejeitar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido à sua consideração. A identidade dos autores e

revisores será mantida de forma confidencial.

Envio de trabalhos

Os trabalhos podem ser enviados por via eletrônica à: envios.acta.ATA@gmail.com ou em CD-ROM por correio postal à: Alsina 1441, oficina 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

No caso de envio eletrônico, indicar no assunto: trabalho para *Acta* e no corpo da mensagem indicar o título do trabalho e os nomes e sobrenomes de todos os autores. Anexar o trabalho (arquivo de Word 2003 ou superior) digitado segundo instruções para autores detalhadas abaixo. Junto com o envio do trabalho deverá ser enviada uma carta ao Diretor em formato Word, com os nomes de todos os autores solicitando a consideração do artigo para publicação. Na carta deverá constar claramente que:

- O trabalho enviado não tenha sido publicado em nenhum outro meio e não será enviado a outra revista científica ou a qualquer outra forma de publicação, enquanto dure a avaliação na *Acta*.
- Todos os autores são responsáveis pelo conteúdo do artigo.
- Todos os autores deverão manifestar se houve ou não conflito de interesses. Se houver financiamento externo, deverá deixar clara a fonte. Assim mesmo, indicar se um ou mais autores tem alguma relação com a companhia comercial cujo produto/s foram empregados ou são mencionados no estudo realizado.
- Em caso do artigo ser publicado, todos os autores cedem os direitos de autor à *Acta*.

Não poderá dar-se por iniciado o processo editorial se a carta não contiver todos os pontos indicados.

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original:

Os trabalhos devem ser digitados em processador de texto (Microsoft Word versão 2003 ou superior), **com espaço duplo** (inclusive resumos, referências e tabelas) com tamanho mínimo de letra Arial 12. As páginas deverão ser numeradas desde a capa. As letras em **negrito** ou *itálico* serão usadas somente quando corresponder.

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho (maiúscula), nomes e sobre-

nomes completos de todos os autores; lugar de trabalho (nome da instituição e endereço postal), se houver autores com distintos lugares de trabalho, deverão ser colocados super-índices numéricos, não entre parênteses, junto aos nomes, para identificar cada autor com seu respectivo lugar de trabalho; fax e/ou correio eletrônico do autor responsável correspondente (que será indicado com um asterisco na posição de super-índice localizado junto ao nome).

Na segunda página será incluído título em inglês e o resumo no idioma do artigo e em inglês, seguido cada um deles de uma lista de quatro palavras-chave, no idioma correspondente. Se o trabalho estiver escrito em inglês, deverá apresentar um resumo em espanhol. As palavras-chave devem começar com letra maiúscula e estar separadas por ponto-e-vírgula.

Introdução. Deve incluir antecedentes atualizados sobre o tema em questão e objetivos do trabalho definidos com clareza.

Materiais e métodos. Deverá conter a descrição dos métodos, equipamentos, reativos e procedimentos utilizados, com detalhes suficientes para permitir a repetição dos experimentos.

Considerações éticas. Em todos os estudos clínicos deverá estar especificado o nome do Comitê de Ética e Investigação que aprovou o estudo e que foi realizado com o consentimento escrito dos pacientes. Em todos os estudos com organismos não humanos, devem estar especificadas as linhas éticas com respeito ao manejo dos mesmos durante a realização do trabalho.

Análises estatísticas. Devem ser informadas as provas estatísticas com detalhe suficiente para que os dados possam ser revisados por outros pesquisadores descrevendo detalhes de cada uma delas. Se for utilizado um programa estatístico para processar os dados, este deverá ser mencionado nesta seção.

Resultados. Deverão ser apresentados através de **uma** das seguintes formas: no texto, ou através de tabelas e/ou figura/s. Deverão ser evitadas repetições e serão destacados somente dados importantes. Deverá ser deixada para a seção Discussão a interpretação mais extensa.

As **tabelas** deverão ser apresentadas em folha à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos, com as **aclarações** correspondentes. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando

números arábicos entre parênteses e super-índice. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

As **figuras** deverão ser apresentadas em folhas à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos. Os desenhos deverão estar em condições que assegurem uma adequada repetição. Os gráficos de barras, tortas ou estatísticas deverão estar no formato GIF. Os números, letras e sinais deverão ter dimensões adequadas para serem legíveis quando forem impressas. As referências dos símbolos utilizados nas figuras deverão ser incluídas no texto da legenda.

As **fotografias** deverão ser feitas em branco e preto, com contraste, em papel brilhante e com qualidade suficiente (mínimo 300 dpi) para assegurar uma boa reprodução. Nos desenhos originais ou fotografias deverão constar, no verso, os nomes dos autores e número de ordem escritos com lápis.

As fotos para versão eletrônica deverão ser realizadas em formato JPEG ou TIFF, com alta resolução. Tanto as figuras quanto as fotografias deverão ser legíveis. O tamanho mínimo deverá ser de média carta, ou seja, 21 x 15 cm, a 300 dpi. Em todos os casos deverá estar indicado o aumento (barra o aumento).

As epígrafes das figuras deverão ser apresentadas exclusivamente em folha à parte, ordenadas e numeradas, e deverão expressar especificamente o que mostra a figura.

Abreviaturas. Serão utilizadas unicamente abreviaturas normalizadas. Deverão ser evitadas as abreviaturas no título e no resumo. Quando no texto se empregar pela primeira vez uma abreviatura, esta deverá ir precedida do termo completo, com exceção se tratar-se de uma unidade de medida comum.

Unidades de medida. As medidas de longitude, tamanho, peso e volume deverão ser expressas em unidades métricas (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serão expressas em graus Celsius e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal, de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderão solicitar que, antes de publicar o artigo,

os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

Nomenclatura. No caso de substâncias químicas será tomada como referência prioritária as normas da IUPAC. Os organismos serão denominados conforme as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico.

Discussão. Terá ênfase sobre os aspectos mais importantes e inovadores do estudo, e serão interpretados dados experimentais em relação com o que já foi publicado. Serão indicadas as conclusões, evitando reiterar dados e conceitos já citados em seções anteriores.

Agradecimentos. Deverão ser apresentados em letra Arial, tamanho 10 e em um parágrafo.

Bibliografia. As citações bibliográficas deverão estar indicadas no texto por meio do sobrenome

de/os autor/es (até dois autores) e o ano de publicação, tudo entre parênteses, separados por ponto-e-vírgula, e no caso de mais de uma citação, deve-se começar pela mais antiga à mais atual. No caso de mais de dois autores, serão indicados o sobrenome do primeiro autor seguido de *et al.* e o ano da publicação.

Exemplos:

“A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância psicoativa mais consumida no mundo (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999)”.

“Em um consenso geral, seria desejável que a ingestão total de cafeína durante a gravidez supere 300 mg/dia (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)”.

As referências bibliográficas completas serão incluídas ao final do trabalho, abaixo do título da Bibliografia Citada, em ordem alfabética, com o nome de todos os autores em cada caso.

Exemplos:

1. Artigo padrão em publicação periódica

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected pa-

tients. N Engl J Med. 2002;347(4):284-287.

2. Livros e monografias

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A.. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

3. Capítulo de livro

Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw- Hill; 2002. p. 93-113.

4. Material eletrônico

a. Artigo em publicação periódica em internet Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [on-line]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>.

b. Página de internet Cancer-Pain.org [en línea]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [atualizado em 16 de Maio de 2002; consulta 9 de Julho de 2002]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>.

c. Parte de uma página de internet American Medical Association [on-line]. Chicago: The Association; c1995-2002 [atualizado em 23 de Agosto de 2001; consulta 12 de Agosto de 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Para a correta citação de possíveis referências bibliográficas que puderam não estar citadas neste documento, consultar o estilo proposto pelo Comitê Internacional de Diretores de Revistas Médicas em “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.