

ISSN 0327-9286

Acta
Toxicológica
Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 21
N° 2
Diciembre 2013

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

Adriana S. Ridolfi

Vicepresidente

Marta A. Carballo

Tesorera

Patricia N. Quiroga

Secretario

María L. Oneto

Vocales

Marcela M. López Nigro

Marta D. Mudry

Claudia P. Lamenza

Vocales Suplentes

María T. Yanicelli

María F. Simoniello

Gerardo D. Castro

Comité Científico

José A. Castro

María I. Díaz Gómez

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Aldo S. Saracco

Órgano de Fiscalización

Mirta E. Ryczel

Claudia V. Vassena

Norma B. Casabé

Tribunal de Honor

Susana I. García

Edda C. Villaamil Lepori

Irma Giolito

Acta Toxicológica Argentina

Director

Adolfo R. de Roodt, *FMed, UBA; MSAL de la Nación*

Comité de Redacción

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

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

Ricardo A. Fernández, *Hosp. Infantil Municipal, Cba; FMed, UCCor*

Susana I. García, *FMed, UBA; PRECOTOX, MSAL de la Nación*

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

Comité de apoyo

Jorge Zavatti, *Dto. de Control Ambiental, Aluar*

Marta D. Mudry, *FCEyN, IEGEBA, UBA, CONICET*

Vanessa Oliveira, *ProNCEZ, MSAL de la Nación*

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. Donnenwald, *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 C. Villaamil Lepori, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

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

INDICE
(CONTENTS)

Artículos

Equivalentes tóxicos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico en Valencia, Venezuela <i>Vargas, Maritza; Romero, Gabriela; Palencia, Aura; Rivero, Exila; Piñero, Sofía</i>	69
Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de <i>Bufo arenarum</i> que habitan ambientes urbanizados <i>Caraffa, Evangelina; Bionda, Clarisa del L.; Pollo, Favio E.; Salas, Nancy E., Martino, Adolfo L.</i>	78
Prevalencia de tabaquismo en el personal del Hospital Santojanni <i>Álvarez Bernárdez, Alejandra Marta; Delgado, Ana Laura; Ripoli, Mario; Nápoli, Mónica.</i>	86
Acute silver toxicity to <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Pisces: Poeciliidae) in a river with extreme water-quality characteristics <i>Casares, María Victoria; de Cabo, Laura I.; Seoane, Rafael; Natale, Oscar</i>	93
Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad <i>in vitro</i> <i>Mateo, Diego; Morales, Paloma; Ávalos, Alicia; Haza, Ana I.</i>	102
Reporte de casos	
Intoxicación con <i>Amanita phalloides</i> : serie de tres casos <i>Cortese, Silvia; Risso, Marina; Trapassi, J. Horacio</i>	110
Instrucciones para los autores	118

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

Equivalentes tóxicos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico en Valencia, Venezuela

Toxic equivalency factors of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in Valencia, Venezuela

Vargas, Maritza*; Romero, Gabriela; Palencia, Aura; Rivero, Exila; Piñero, Sofía

Unidad de Investigación en Toxicología Molecular (UTM). Escuela de Bioanálisis, Sede Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Estado Carabobo, Venezuela. Código Postal 2005.

*mvargas@uc.edu.ve

Recibido: 9 de mayo de 2012

Aceptado: 16 de septiembre de 2012

Versión final recibida: 9 de septiembre de 2013

Resumen. El particulado atmosférico de las áreas urbanas contiene mezclas de compuestos contaminantes con diferentes grados de toxicidad como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), provenientes de las emisiones de combustión incompleta de diversas fuentes no naturales. Los HAPs pueden provocar cáncer, malformaciones congénitas, trastornos del sistema nervioso, entre otros, al ser absorbidos, ya sea por inhalación o ingesta. El factor de equivalencia de toxicidad (FET), es un parámetro estimativo que relaciona la toxicidad de un compuesto con un componente de referencia, cuyo objetivo es evaluar la toxicidad y el riesgo de diversas sustancias y, en el caso de HAPs, el benzo(a)pireno (BaP) es el compuesto de referencia. El objetivo de este trabajo fue estimar el riesgo potencial de exposición a HAPs en habitantes de la zona de estudio a través de los FET. Catorce HAPs fueron extraídos del particulado atmosférico colectado en filtros y analizados por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de fluorescencia. Se determinó la concentración de los HAPs, se calculó la concentración tóxica equivalente para cada compuesto y de la mezcla total de acuerdo al método propuesto por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos. La concentración promedio total de HAPs en el particulado fue de 1,97 ng/m³. La contribución del BaP fue del 2,54% en la mezcla total de HAPs. La concentración tóxica equivalente total fue de 0,08 ng/m³ de la mezcla de aire. Las concentraciones tóxicas equivalentes para cada HAP y para el total en el particulado atmosférico no exceden el valor de 1 ng/m³ en equivalentes de BaP, indicado en diversas regulaciones internacionales.

Palabras clave: HAPs; Factor equivalente de toxicidad; Riesgo de cáncer; Particulado atmosférico.

Abstract. The atmospheric particulate from urban areas contains mixtures of contaminants with different degrees of toxicity such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) derived from emissions from incomplete combustion of various natural sources. PAHs can cause cancer, birth defects and nervous system disorders when they are absorbed either by inhalation or ingestion. The toxic equivalency factor (TEF) is a parameter that relates the toxicity of a compound with a reference component in order to evaluate the toxicity and risk of various substances. The benzo(a)pyrene (BaP) is the reference compound in the case of PAHs mixture. The aim of this study was to estimate the potential risk of exposure to PAHs in people of the study area through the TEF. Fourteen PAHs were extracted from particulate filters and analyzed by liquid chromatography- fluorescence detection. The concentration of PAHs was calculated. The total average concentration of PAHs in the particulate was 1.97 ng/m³. Then, the equivalent toxic concentration of each compound and the total mixture were calculated too according to the method proposed by the United States Environmental Protection Agency (EPA). The contribution of BaP was 2.54% in the total mixture of PAHs. The total equivalent toxic concentration was 0.08 ng/m³ in the air mixture. The toxic equivalent concentrations for each PAH and the total in the atmospheric particulate were not exceeding the value of 1 ng/m³ in BaP equivalent that is the level indicated in international regulations.

Keywords: PAHs; Toxicity equivalent factor; Risk; Atmospheric particulate.

INTRODUCCIÓN

Los riesgos planteados por la exposición a mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) han sido evaluados a lo largo del tiempo por diversas organizaciones y agencias internacionales (Environmental Protection

Agency (EPA) 1984; World Health Organization (WHO) 1987; Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 1995; Comisión Europea 2001; International Agency for Research on Cancer (IARC) 2012), estableciéndose las características y propiedades carcinogénicas

y mutagénicas, de las emisiones así como de cada hidrocarburo presente en la mezcla (IARC 2012). El benzo(a)pireno (BaP) es el HAP más ampliamente estudiado. Existe abundante información en cuanto a su toxicidad y a su relación directa con otros HAPs, así como estudios experimentales con animales que han confirmado la carcinogenicidad y la formación de tumores después de la inhalación (Gelboin 1980; Gil y col. 1996; Mastandrea y col. 2005). Por estar clasificado como una sustancia del tipo 1A (carcinógeno humano) (ATSDR 1995; EPA 2006; IARC 2012), la cuantificación del BaP en la mezcla total de aire ha sido propuesta para evaluar el riesgo relativo a la salud asociado a la exposición a HAPs (Petry y col. 1996).

Considerando que las mezclas de HAPs presentan variaciones en su composición y proporción, según el origen de la emisión (Fang y col. 2002; Omar y col. 2002; Donalson y col. 2005; Norramit y col. 2005; Turrio-Baldassarri y col. 2006; Tham y col. 2007), la EPA en 1993 propone el cálculo del Factor de Equivalencia de Toxicidad (FET), que es una metodología cuyo objetivo es evaluar la toxicidad y el riesgo de diversas sustancias (Nisbet y LaGoy 1992; Petry y col. 1996). El FET es un parámetro estimativo que relaciona la toxicidad de un compuesto con un componente de referencia, que para el caso de los HAPs, es el BaP (Van der Berg y col. 2006). Mediante este factor se puede encontrar un estimado de la toxicidad generada por una fuente variable, es decir se calcula una ponderación de cuán tóxica es una emisión (Rojas y col. 2011).

El cálculo del FET se ha empleado en diversas investigaciones, entre las que se pueden citar la realizada por Fang y col. (2002) quienes investigaron los HAPs en fase gaseosa y en particulado en áreas rurales y urbanas de una ciudad en Taiwan. Los resultados indican que las concentraciones son superiores en los sitios urbanos debido a las emisiones de procesos industriales.

El cálculo de factores de equivalencia del BaP, indica un riesgo mayor en estos sitios, sin embargo concluye que el riesgo es aceptable en el aire ambiental del centro de Taiwan.

Asimismo en Curitiba (Brasil), se determinó la concentración de HAPs en material particulado atmosférico, donde las relaciones moleculares indicaron que la fuente de emisión de HAPs son los vehículos a gasolina, en el área de baja población, y los de diesel en la

de tráfico pesado. El cálculo del FET para el BaP indicó un bajo riesgo asociado a la exposición de HAPs totales en el aire (Froehner y col. 2010). Resultados similares se obtuvieron en Teherán, en donde el número anual de casos de cáncer atribuibles a HAPs cancerígenos fue estimado en 58 personas por millón (Halek y col. 2008).

Con casi 2 millones y medio de habitantes (1.435 hab/Km²) (Instituto Nacional de Estadística (INE) 2011), Valencia (Venezuela) es la capital de un estado industrial por excelencia cuya zona urbana se caracteriza por su gran actividad comercial y alta densidad vehicular con aproximadamente 500.000 automóviles particulares (Lílido y Ramirez 2012). Tiene una temperatura media anual de 26,7°C, con precipitaciones promedio de 70 mm anuales y un periodo lluvioso de mayo a noviembre (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH) 2012). Esta ciudad se asienta en un valle a 427 msnm, en el que los vientos alisios soplan de norte-este al sur-este, con una velocidad promedio de 10 Km/h (Observatorio Oceanográfico Digital de Venezuela (O.O.D) 2012). Considerando que los factores antes mencionados favorecen la emisión de HAPs al ambiente, el propósito de este estudio fue estimar el riesgo potencial de exposición a estos contaminantes a través de los FET en dicha ciudad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio comprende la determinación de la concentración y las características de los HAPs enlazados al particulado atmosférico, la evaluación de la toxicidad y la valoración del riesgo de la mezcla de ellos en el aire. Para ello se analizaron 14 HAPs nftaleno (Naf), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Fen), antraceno (Ant), pireno (Pir), benzo(ghi)perileno (BghiP), benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cris), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), dibenzo(a)antraceno (DBA), e indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind). Estos últimos siete son cancerígenos potenciales, mutagénicos y genotóxicos para los humanos (US EPA 1993; IARC 2012).

El muestreo se realizó en la avenida Bolívar norte de la ciudad de Valencia, sector el Viñedo, entre la avenida Carlos Sanda y la avenida 147, del Estado Carabobo, Venezuela. El equipo muestreador de partículas se ubicó en la azotea del edificio de 3 pisos de altura, donde funciona una institución educativa. (Figura 1)

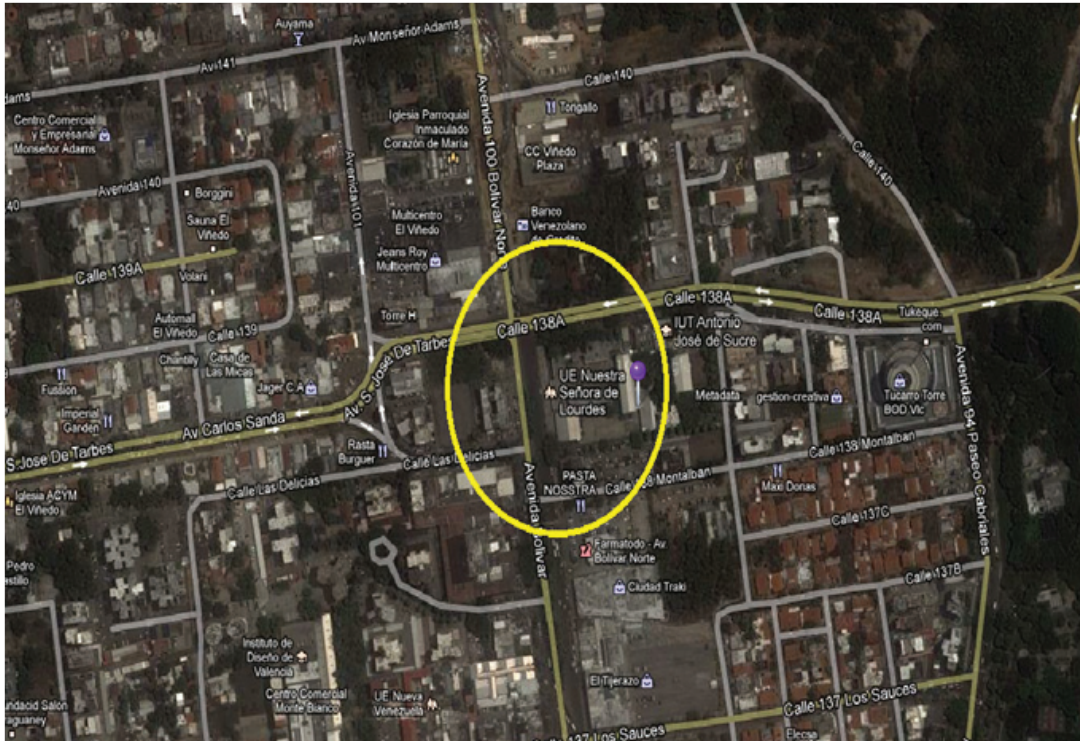


Figura 1. Fotografía aérea de la avenida Bolívar de Valencia con el punto donde fue realizado este estudio (Google Earth 6., 2012)

Colección de partículas totales

La recolección de particulado atmosférico se realizó de manera interdiaria, durante el primer trimestre del año 2007, durante la estación de sequía, de acuerdo a lo descrito en la norma de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) 2060 (2006).

Veinte muestras de particulado atmosférico (24 horas) presente en el aire de la zona de estudio, fueron captadas usando un sistema automático de colección con captación en filtros Whatman, 20,8 x 25 cm², grade G653, colocados en un muestreador de alto volumen M5, Tish Environment con regulador de voltaje, contador numérico de tiempo, temporizador mecánico modelo 70 y registrador de flujo de carta circular. La concentración de HAPs en el particulado atmosférico (ng/m³) se calculó a partir de la masa de partículas totales suspendidas (PTS) recolectadas y el volumen de aire que pasó a través de los filtros. Se fijó el filtro sobre una rejilla con un caudal de aspiración de aire de 1,4 m³/min. Se cerró la caseta y se dejó transcurrir 24 h. Se desinstaló el filtro utilizado y se dobló sobre la misma cara. Se introdujo dentro de un sobre de papel, protegido de la luz con una película de aluminio y guardado en una bolsa plástica con cierre

hermético, fue transportado en cava con hielo a nevera de -20 °C para su posterior análisis.

Extracción y análisis de los HAPs

Para la extracción y análisis de los HAPs se implementó el método MTA/MA-039/A00 del Instituto de Seguridad e Higiene del Trabajo del Ministerio del Trabajo y Asuntos Sociales de España (2006) y el descrito en la norma venezolana COVENIN 2060, esquema 44:2-002, ICS 13.040 (2006).

Un área determinada y representativa del filtro se segmentó para someterla a extracción con ciclohexano (Fisher Scientific HPLC grade UV), y ultrasonido a 20°C, por 15 min, 2 veces. Luego de 30 minutos en reposo, se decantó el extracto y se pasó por filtro de 0,45 µm. Para garantizar la limpieza del extracto se acondicionó un cartucho SPE C-18 Supelco, con 3 ml de hexano (Mallinckrodt ChromAR® HPLC5167), se agregó la muestra y finalmente se eluyó con diclorometano (Fisher Scientific HPLC grade UV) en un balón que se llevó al rotaevaporador a 40°C. El residuo se reconstituyó con 2 ml de acetonitrilo (CH₃CN) (J.T. Baker HPLC grade 9017-03) para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Parámetros de operación

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido de alta resolución Perkin Elmer NCI 900, interfaz acoplado a un detector de fluorescencia y bomba Perkin Elmer de la Serie 200, Software Total Chrom Navigator 6.3.0.0445, columna LC-PAH, 5 µm x 15 cm Supelcosil, equipado con loop de 20 µl. La fase móvil CH₃CN: H₂O, en gradiente de 55 a 100% de CH₃CN, hasta completar un tiempo de corrida de 65 min con flujo de 1 ml/min, y longi-

tudes de excitación y emisión variables entre 257 a 482 nm. Cada muestra se inyectó por duplicado. A partir de la mezcla certificada por EPA 610 (Supelco, Mix catalog N° 48743, Methanol:Methylene Chloride 1:1) se prepararon diluciones para las curvas de calibración de cada uno de los HAPs usando estándar externo y solvente CH₃CN (J.T. Baker HPLC grade). El cromatograma de los 14 HAPs detectados con fluorescencia, se muestra en la *Figura 2*.

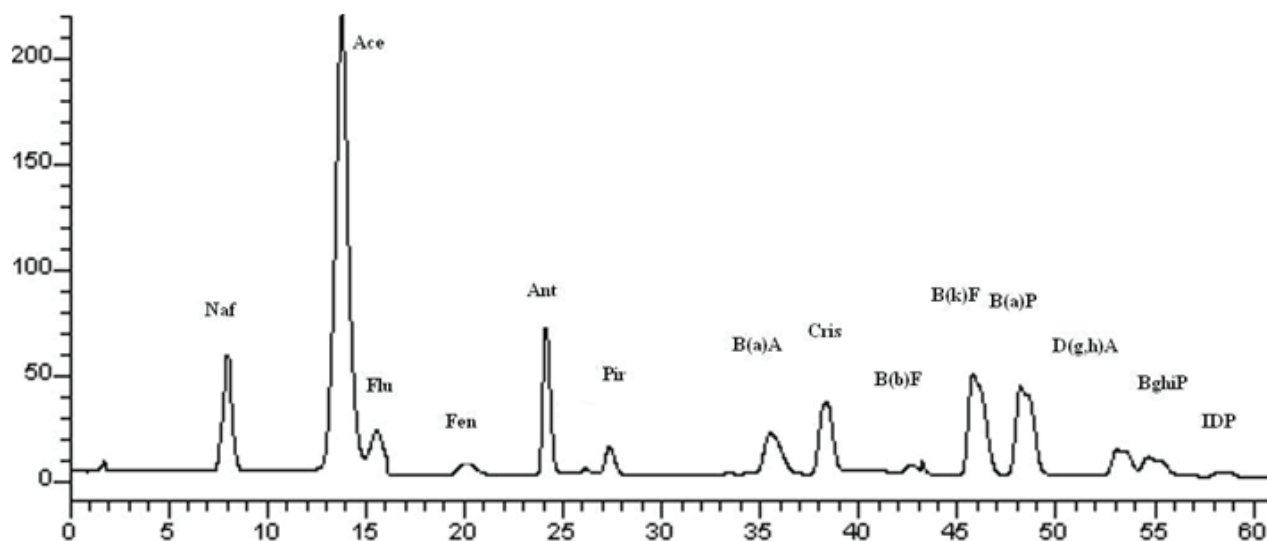


Figura 2. Cromatograma de HAPs presentes en la mezcla EPA, 200 ng/mL

Cada compuesto fue identificado por su tiempo de retención y cuantificado por el área de integración interpolada en la curva de calibración (*Tabla 1*). El porcentaje de recuperación fue de 80% en promedio. Los límites de detección se calcularon entre 3,61 ng/ml para el DBA y 126, 52 ng/ml para el naftaleno.

El cálculo para los factores equivalentes tóxicos (FET), concentración tóxica equivalente de BaP (CTE) y la concentración tóxica equivalente total (CTET), fue realizado según lo refieren Nisbet y La Goy (1992) utilizando la ecuación 1. Donde C_n es la concentración del HAP en el particulado atmosférico y FET el factor de equivalencia de toxicidad (FET) del HAP correspondiente. Se realizó un análisis descriptivo y de correlación (Pearson). El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 17.0

Ecuación 1

$$CTET = \sum C_n * FET$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el muestreo las temperaturas en la zona de estudio oscilaron entre 27 y 38°C. El estudio reveló la presencia de 13 HAPs en el particulado de la zona, observándose la ausencia de acenafteno. La concentración de HAPs totales fue 1,97 ng/m³, valor que es comparable a lo obtenido en algunas zonas no urbanas en Malasia y Grecia o urbanas como la de Texas (Tham y col. 2007). Con respecto a la ciudad de Méjico fue menor a la reportada en el 2010 por Mugica y col. (1,99 - 10,48 ng/m³), así como en Tarragona, España (1,39 - 5,61 ng/m³) (Ramirez y col. 2011), y Agra (India) con HAPs entre 8,04 y 97,93 ng/m³ (Masih y col. 2010). Sin embargo, los científicos insisten en que la presencia de HAPs, aun a bajos niveles en el aire, produce efectos adversos a la salud (IARC 1984; ATSDR 1995; Pereira y col. 2000; Donalson y col. 2005; Bosetti y col. 2007).

En la presente investigación los HAPs identificados en la mezcla de aire fueron clasificados

Tabla 1. Ecuaciones de las curvas de calibración de HAPs

HAP	Abrev.	Ecuación de la recta	R ²	Límite de detección de recta (ng/mL) (ng/m ³)	L.D.
Naftaleno	Naf	Y=1009,2X	0,9886	126,52	2,36
Acenafteno	Ace	Y=6098,6X	0,9943	89,91	1,68
Fluoreno	Fluor	Y=2591,7X	0,9689	49,75	0,93
Fenantreno	Fen	Y=2304,9X	0,9893	13,22	0,25
Antraceno	Ant	Y=11280X	0,9919	9,73	0,18
Benzo(a)antraceno	BaA	Y=10648X	0,9729	67,99	1,27
Criseno	Cris	Y=9422,8X	0,9836	22,13	0,41
Benzo(b)fluoranteno	BbF	Y=3068X	0,9860	9,79	0,18
Benzo(k)fluoranteno	BkF	Y=13562X	0,9870	62,49	1,17
Benzo(a)pireno	BaP	Y=13045X	0,9882	25,63	0,48
Dibenzo(a,h)antraceno	DBahA	Y=2138,9X	0,9991	23,60	0,44
Benzo(g,h,i)perileno	BghiP	Y=1432,9X	0,9835	3,61	0,07
Indeno(1,2,3 c-d)pireno	Ind	Y=444,03X	0,9578	62,48	1,17
Pireno	Pir	Y=2246X	0,9460	83,82	1,56

Y = Área del pico – Área del blanco = (μV. s)

X = Concentración de HAP (ng/mL)

L.D. = Límite de detección (*) Calculado por el método de Miller y Miller (1993).

de acuerdo a sus propiedades carcinogénicas; los de bajo peso molecular, no carcinógenos (2 y 3 anillos), fueron los más abundantes (87,1%), mientras que los de alto peso molecular, considerados carcinógenos (4 a 6 anillos), se encontraron en menor concentración (12,9%). Proporciones similares se hallaron en Teherán, Irán, con un 13,5% pero donde la concentración de HAPs fue alarmante (35,85 ng/m³) (Halek y col. 2008). Estos resultados difieren de los de Norramit y col. (2005), quienes reportaron 91,7% de HAPs de alto peso molecular en Bangkok y con los de Eiguren-Fernández y col. (2003) quienes publicaron que, en Los Ángeles, California, HAPs de mayor peso molecular estaban en mayor proporción. Todos los HAPs hallados en el particulado de la zona estudiada son mutagénicos a excepción del naftaleno (mayor proporción), fluoreno y antraceno. Es importante acotar que, aunque la concentración de cancerígenos es inferior a la de no cancerígenos, la presencia de HAPs en el aire, asociados a partículas respirables, puede retardar el metabolismo y posterior eliminación de éstos, lo que pro-

piciaría la bioacumulación en el organismo (cabello y grasas) (Pereira y col. 2000). Estos compuestos presentes en el aire representan un peligro al ser inhalados, absorbidos o ingeridos con alimentos ya que al entrar en contacto con las reacciones propias del organismo pueden producir deterioro en el ADN, aberraciones cromosómicas y mutagenicidad que conllevarían a enfermedades graves (Pereira y col. 2000; Fang y col. 2002; Donaldson y col. 2005; Mastandrea y col. 2005; Díaz y col. 2006; Kocbach y col. 2006).

En cuanto a la correlación entre los HAPs se encontró que los de 2 a 4 anillos, clasificados como de bajos efectos cancerígenos se relacionan entre sí. Además, se halló relación entre el BaP y BkF, Cris, Pir y BghiP (p<0,05). También existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre los HAPs totales y los de bajo peso molecular. Esta relación permite estimar la probable existencia de los HAPs peligrosos anteriormente nombrados con sólo hallar el BaP en el particulado.

También se encontró que la relación molecular entre el benzo(a)antraceno y el criseno (BaA/

Cris) era de 0,54, razón que permite deducir que los HAPs presentes en el particulado atmosférico provienen mayormente de emisiones vehiculares y de emisiones de aceites de motor (Fang y col. 2006; Tham y col. 2007). La presencia del pireno y criseno es consecuencia de las emisiones diesel, clasificadas recientemente en el grupo 1A (IARC 2012), el benzo(g,h,i)perileno y el antraceno provienen de la gasolina y el benzo(a)antraceno de la combustión de gas natural (Norramit y col. 2005; Tham y col. 2007).

Al utilizar la concentración del B(a)P como indicador total de HAPs, se puede decir que la presencia de estos compuestos en el ambiente en estudio es baja. En este sentido, el 91% de las muestras recolectadas en esta investigación presentaron concentraciones de BaP inferiores a 0,12 ng/m³. El intervalo de la concentración de BaP fue de 0 a 0,18 ng/m³, y es comparable al de la ciudad de Méjico (0,04 - 0,71 ng/m³), Eorden Basin en Grecia, Xiamen en China y las Palmas en Gran Canaria donde los niveles de BaP fueron de 0,02 a 0,82; 0 a 0,06 y 0,08 a 0,6 ng/m³, respectivamente (Mugica y col. 2010) y con ciudades de Japón, 0,1

a 0,2 ng/m³ (Tham y col. 2007), pero 100 veces inferiores a Santiago de Chile con 18,25 ng/m³ de BaP (Gil y Adonis 1996) y a otras ciudades como Roma, en Italia; Bangkok, en Tailandia; Sao Paulo, en Brasil; Nueva Delhi, en India donde los niveles fueron 0,1 a 6,2; 0,3 a 13; 0,4 a 2,2; 14 a 48 ng/m³, respectivamente (Mugica y col. 2010).

Los resultados de los FET, CTE y CTET se presentan en la *Tabla 2*. Se observan concentraciones comparables a las encontradas en zonas poco habitadas de Malasia (Omar y col. 2002) lo que sugiere que el riesgo para la salud de los habitantes de la zona es bajo, con 0,08 ng/m³ como CTET, mucho menor al propuesto por la Comisión Europea (1 ng/m³), así como los hallados en Curitiba, Brasil (0,45 a 1,12 ng/m³) (Froehner y col. 2010), menor a Tarragona, España (0,067 a 1,059 ng/m³) (Ramírez y col. 2011) y Taichung, Taiwan (3,66 ng/m³) (Fang y col. 2002) y aun más contrastante con el de Magra en la India (7,4 ng/m³) (Masih y col. 2009), en donde, fundamentados en la clasificación reciente de estos compuestos, existiría un mayor riesgo de desarrollar cáncer debido a la exposición.

Tabla 2. Concentraciones de HAPs en el particulado atmosférico, factores de toxicidad equivalente y BaP equivalente (BaP eq) y la concentración tóxica equivalente total en zona de estudio

HAP	% *	ng/m ³					ng/m ³	
		FET a	Mediana	Media	SD	Rango	FET b	CTE
Naf	26,40	0	0	0,52	1,27	ND - 5,40	0,001	0
Ace	0	0	0	0	0,01	ND - 0,04	0,001	0
Fluor	20,30	0	0	0,40	0,85	ND - 2,99	0,001	0
Fen	2,03	0	0	0,04	0,12	ND - 0,48	0,001	0
Ant	14,72	0	0,25	0,29	0,28	ND - 0,79	0,01	0,003
Pir	46,19	0	0	0,91	0,77	ND - 2,82	0,001	0,001
BaA	3,05	1	0,01	0,06	0,09	ND - 0,31	0,1	0,006
Cris	5,58	1	0,08	0,11	0,11	ND - 0,44	0,01	0,001
BbF	1,02	1	0	0,02	0,05	ND - 0,18	0,1	0,002
BkF	0,51	1	0	0,01	0,01	ND - 0,03	0,1	0,001
BaP	2,54	1	0,03	0,05	0,05	ND - 0,18	1	0,05
DBahA	0,51	1	0	0,01	0,02	ND - 0,06	1	0,01
BghiP	3,55	0	0,04	0,07	0,11	ND - 0,40	0,01	0,001
Ind	3,55	1	0,06	0,07	0,08	ND - 0,25	0,1	0,007
Total	100	-	0,47	1,97	3,82	ND - 14,37	CTET	0,082

FET: Factor de equivalencia tóxica (US EPA 1993)

CTE: Concentración tóxica equivalente o BaP equivalente (BaP eq)

CTET: Concentración tóxica equivalente total de la mezcla

(*)Relación porcentual en el particulado atmosférico

(**)Concentración en el particulado atmosférico (ng/m³)

(a)Factor de Equivalencia Toxicológica U.S 1984

(b)Factor de Equivalencia Toxicológica Nisbet y LaCoy

CONCLUSIÓN

En el particulado atmosférico de la zona estudiada, se hallaron 13 HAPs en la mezcla, provenientes de emisiones vehiculares, de aceites de motor y combustión de gas natural, de los cuales el 12,9% correspondió a HAPs peligrosos de alto peso molecular. La concentración promedio de HAPs totales fue 2,56 ng/m³ similar a algunas zonas no urbanas de otros países, por lo que al calcular la concentración tóxica equivalente total, CTET y resultar 0,08 ng/m³, se puede estimar este valor como de bajo riesgo ya que se encuentra por debajo de lo propuesto en diversas regulaciones internacionales (1 ng/m³ en BaP eq) y el planteado por la Comisión Europea (2001). Debido a las implicaciones de estos compuestos en la salud pública es recomendable complementar los hallazgos obtenidos con la evaluación de la fase gaseosa de la mezcla de aire de la zona de estudio así como el biomonitorio de la población.

Agradecimientos: los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) quien subvencionó parte de este proyecto según oficio N° CDCH-UAC-1069-07 del 14 de Diciembre 2007.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Agency for toxic substances and disease [en línea]. Toxicological profile for Polycyclic aromatic hydrocarbons. 1995 Aug. [consulta: 15 de enero de 2013]. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=122&tid=25>

Bosetti C., Boffetta P., La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol.* 2007;18:431-446.

Calidad de Aire. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Norma COVENIN 2060. Esquema 44:2:002, ICS 13.040. 2006.

Comisión Europea [en línea]. Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Position Paper. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2001. ISBN 92-894-2057-X. [consulta: 12 de enero de 2013]. Disponible en http://ec.europa.eu/environment/air/pdf/pp_pah.pdf

Díaz F., López D., Pérez I., Batres L., Yañez L. Evaluación del riesgo para las sustancias tóxicas persistentes. Instituto Nacional

de Ecología. 2006. Capítulo 7. Méjico. [consulta: 31 de enero de 2013]. Disponible en <http://www.ine.gov.mx/ueajei/publicaciones/libros/447/cap7.html>.

Donaldson K., Tran L., Jimenez L.A., Duffin R., Newby D., Mills N., MacNee W., Stone V. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* [en línea]. 2005;2:10. [consulta: 30 de enero de 2013]. Disponible en <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/2/1/10>.

Eiguren-Fernández A., Miguel H. Determination of Semivolatile and Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in SRM 1649a and PM 2.5 Samples by HPLC-Fluorescence. *Polycyclic Aromat Comp.* 2003;23:193-205.

Environmental Protection Agency [en línea]. Polycyclic organic matter (POM). Technology transfer network air toxics website. 2006. U.S. [consulta: 30 de enero de 2013]. Disponible en <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/polycycl.html>.

Environmental Protection Agency. Health effects assessment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). EPA 549/1-86-013, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH. 1984.

Fang G.C., Chang K.F., Lu Ch., Bai H. Toxic equivalency factors study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taichung City, Taiwan. *Toxicol Ind Health.* 2002;18:279-288.

Fang G.C., Wu Y.S., Chang C.N., Ho T.T. Characteristic of polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and source identification for fine and coarse particulates at Taichung Harbor near Taiwan Strait during 2004-2005. *Chemosphere.* 2006;(366) 729-738.

Froehner S., Maceno M., Machado K.S., Malheiros A. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulate matter in Curitiba, Brazil and benzo(a)pyrene toxic equivalency factors (TEFs). *J Environ Sci Heal A.* 2010;45, 1347-1352.

Gelboin H. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 1980;60 (4).

Gil L.D. Adonis M.I. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenic activities of organic extracts from airborne particles in Santiago de Chile. *Indoor Built Environ.* 1996;5(1) 155-164.

Google Earth 6.2. [en línea]. U.S. Dept of State Geographer. © 2012 Google. © 2012 Mapalink/Tele Atlas. Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO. [consulta: 12 de enero del 2013]. Disponible en <http://www.google.com/intl/es/earth/download/ge/agree.html>.

Halek F., Nabi Gh., Kavousi A. Polycyclic aromatic hydrocarbons study and toxic equivalency factor (TEFs) in Tehran, Iran. *Environ Monit Assess.* 2008;14:303-311.

Instituto de Seguridad e Higiene del Trabajo en línea. Determinación de hidrocarburos policíclicos en aire. Método de captación en filtro y tubo adsorbente y detección fluorimétrica / Cromatografía líquida de alta resolución. Método MTA/MA-039/A00. Ministerio del Trabajo y Asuntos Sociales de España. 2006. [consulta: 13 de enero del 2013]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/MetodosAnalisis/Ficheros/MA/MA_039_A00.pdf

Instituto Nacional de Estadística en línea. Censo de la Nación. 2011. [consulta: 13 de enero del 2013]. Disponible en http://www.ine.gov.ve/documentos/Demografia/CensodePoblacionyVivienda/pdf/presentacion_carabobo.pdf.

Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología en línea. Mapas de precipitaciones. 2012. [consulta 12 de enero del 2013]. Disponible en: <http://www.inameh.gob.ve/mp.php>.

International Agency for Research on Cancer en línea. Censo de la Nación. 2011. [consulta: 13 de. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 32. World Health Organization. 2012. [consulta 12 de enero del 2013]. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.

Kocbach A., Li Y., Yttri K., Cassee F., Schwarze P., Namork E. Physicochemical characterization of combustion particles from vehicle exhaust and residential wood smoke. *Part Fibre Toxicol.* 2006;3(1).

Lílido N., Ramírez I. El parque automotor en la República Bolivariana de Venezuela 1990-2011, estratos medios de la población y elecciones 2012. *Mundo Universitario.* 2012;vol X (1): 38-48.

Masih A., Saini R., Singhvi R., Taneja A. Concentrations, sources, and exposures profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in particulate matter (PM10) in the north central part of India. *Environ Monit Assess.* 2006;163:421-431.

Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquim Clin L,* 2005;39 (1): 27-36.

Mugica V., Hernández S., Torres M., Garcia R. Seasonal Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Levels in Mexico City. *JAir Waste Manage.* 2010;60:548-555.

Nisbet I.C., LaGoy P.K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul toxicol pharm.* 1992;16(3):290-300.

Norramit P., Cheevaporn V., Itoh N., Tanaka K. Characterization and carcinogenic risk assessment of polyaromatic hydrocarbons in the respirable fraction of airborne particles in the Bangkok metropolitan area. *J. Health Sci.* 2005;51,437-446.

Observatorio Oceanográfico Digital [en línea]. Venezuela. [consulta 13 de enero del 2013]. Disponible en: <http://ood.cbm.usb.ve/aplicaciones>.

Omar N.Y.M.J., Abas M.R.B., Ketuly K.A., Tahir N.M. Concentrations of PAHs in atmospheric particles (PM-10) and roadside soil particles collected in Kuala Lumpur, Malaysia. *Atmos Environ.* 2002;36,247-254.

Pereira A., Moreira J., Arbilla G., Ferreira L., Oliveira A., Berek J. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAs): A review of methodology. *Quim Nova.* 2000;23:765-73.

Petry T., Schmid P., Schlatter C. The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Chemosphere*. 1996; 32:639-48.

Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in air: quality guidelines for Europe. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 105-17.1987.

Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons en línea. EPA/600/R-93/089, july, 1993. US EPA. [consulta 13 de enero del 2013]. Disponible en <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/reordisplay.cfm?deid=49732#Download>.

Ramírez N., Cuadras A., Rovira E., Marcé R.M., Borrull F. Risk assessment related to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particle phases near industrial sites. *Environ Health Persp.* 2011;119:1110-1116.

Rojas N. Milquez H. Characterizing priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)

in particulate matter from diesel and palm oil-based biodiesel B15 combustion. *Atmos Environ.* 2011;45:6158-6162. doi:10.1016/j.atmosenv.2011.08.016.

Tham Y., Ozaki N., Sakugawa H. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aerosol of Hinagashi Hiroshima, Japan: pollution scenario and source identification. *Water Air Soil Poll.* 2007;182 (1-4), 237-243.

T
urrio-Baldassarri L., Battistelli C. L., Conti L., Crebelli R., De Berardis B., Lamiceli A.L., Gambino M., Iannaccone S. Evaluation of emission toxicity of urban bus engines: Compressed natural gas and comparison with liquid fuels. *Sci Total Environ*, 2006;355, 64-77.

Van den Berg M., Birnbaum L., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A. The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins-like compounds. *Toxicol Sci.* [en línea]. 2006;93(2): 223-224. [consulta: 13 de enero del 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829543>.

Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados
Determination of micronuclei frequency in erythrocytes of *Bufo arenarum* inhabiting urbanized environments

Caraffa, Evangelina¹; Bionda, Clarisa del L.^{1,2}; Pollo, Favio E.^{1,2}; Salas, Nancy E.¹; Martino, Adolfo L.¹

¹Ecología, Dpto de Cs Naturales, Fac Cs Exa Fco-Qca y Nat. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - Km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Córdoba-Argentina. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. faviopollo@gmail.com

Recibido: 2 de enero de 2013
Aceptado: 20 de julio de 2013

Resumen. Los anfibios son constituyentes integrales de ecosistemas naturales y agrícolas, y debido a su sensibilidad pueden ser utilizados como bioindicadores. La frecuencia de micronúcleos se emplea como un biomarcador que evalúa la respuesta a agentes genotóxicos. El objetivo del trabajo fue determinar y comparar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes antrópicos de la ciudad de Río Cuarto. Se escogieron tres sitios modificados: un lago urbano Lago Villa Dálcar (33°06'S-64°22'W) y dos sitios de cultivo denominados Cultivo1 (33°05'S-64°26'W) y Cultivo 2 (33°05'S-64°25'W). Como control se escogió un área ubicada en las sierras de Comechingones, en el Campo Experimental Las Guindas (32°35'S-64°42'W), pertenecientes a la UNRC. En cada sitio se recolectaron ocho individuos utilizando trampas de caída y relevamientos por encuentros visuales. A cada individuo se le extrajo sangre de la vena angularis inmediatamente después de la captura. Se realizaron dos extendidos por cada individuo, se dejaron secar al aire por 24 hs, luego se fijaron con metanol por 20 minutos y se colorearon con Giemsa al 5% durante 10 minutos. Posteriormente los frotis fueron analizados con microscopio (1000X) y se tomaron fotografías con cámara digital. La frecuencia de micronúcleos fue contabilizada para 4000 células por individuo. Se realizaron comparaciones utilizando el test de Kruskal-Wallis. Las frecuencias de micronúcleos encontradas son: Las Guindas: 0,17 ± 0,23; Cultivo1: 0,78 ± 0,28; Cultivo 2: 0,61 ± 0,45 y Villa Dálcar: 0,76 ± 0,47. Existen diferencias significativas entre el control y los demás sitios (p<0,01). Los resultados obtenidos demuestran la relevancia en la aplicación del test de micronúcleos *in vivo* en anfibios anuros para comparar distintos ambientes. Estos resultados indicarían la necesidad de nuevas investigaciones y de un monitoreo más prolongado en el tiempo para estos ambientes, incluyendo por ejemplo otros tipos de biomarcadores, así como otras posibles especies representativas de la región.

Palabras claves: Micronúcleos; Anfibios; *Bufo arenarum*; Agroecosistemas.

Abstract. Amphibians are integral constituents of natural and agricultural ecosystems, and because of their sensitivity can be used as bioindicators. Micronuclei test is used as a biomarker for determining the response to genotoxic agents. The purpose of this study was to determine and compare the frequency of micronuclei in peripheral blood erythrocytes of *Bufo arenarum* toads that inhabiting anthropic environments for the city of Río Cuarto. Organisms used in the MN test were collected from three sites modified: an urban lake Villa Dalcar (33°06'S-64°22'W) and two cultivation sites called Crop 1 (33°05'S-64°26'W) and Crop 2 (33°05'S-64°25'W). As a control site, an area in the mountains of Comechingones, Las Guindas (32°35'S-64°42'W), belonging to the UNRC was sampled. At each site, eight individuals were collected using pitfall traps and by visual encounter surveys. To each individual is bled from the vein angularis immediately after capture. We performed two extended for each individual, air-dried for 24 hours, then fixed with methanol for 20 minutes and stained with 5% Giemsa for 10 minutes. Then the smears were analyzed with microscope (1000X) and took pictures with digital camera. For each individual the frequency of micronuclei for 4000 cells was recorded. Comparisons were made using the Kruskal-Wallis test. Micronuclei frequencies found are: Las Guindas: 0.17 ± 0.23; Crop 1: 0.78 ± 0.28, Crop 2: 0.61 ± 0.45 and Villa Dalcar: 0.76 ± 0.47. There are significant differences between the control and the other sites (p<0.01). These findings show the relevance in the application of micronucleus test in vivo for anuran amphibians to compare different environments. These results suggest the need for further research and monitoring longer time for these environments, including such other biomarkers, as well as other possible species representative of the region.

Keywords: Micronuclei; Amphibians; *Bufo arenarum*; Agroecosystems.

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las perturbaciones de origen antropogénico asociado a los ambientes utilizados por los anfibios, es una de las causas principales de la disminución y modificación de los hábitats naturales, y en consecuencia, es considerada un factor relevante en la declinación registrada en los anfibios en las últimas décadas (GAA 2004; Stuart y col. 2004; Beebee y Griffiths 2005; Collins y Crump 2009; Peltzer y col. 2011). La proporción de bosques convertidos en tierras agrícolas está ocurriendo rápidamente en algunas áreas neotropicales (Pengue 2005; Rossi 2006). La modificación y destrucción del paisaje por esta actividad, es ocasionada principalmente debido a la presencia de ganado, el laboreo de la tierra para la siembra de cultivos y la incorporación excesiva de ciertos nutrientes a través de la aplicación de biocidas y fertilizantes, entre otros factores (Pengue 2005; Altieri y Pengue 2006). Los anfibios son componentes integrales de los ecosistemas naturales y agrícolas, y debido a su piel permeable y húmeda, escasa movilidad y su ciclo de vida complejo con estadios de vida acuático y terrestre, constituyen organismos sensibles a la calidad del medio ambiente y por tanto vulnerables a los contaminantes ambientales (Young y col. 2004). Numerosos trabajos realizados en condiciones de laboratorio han demostrado los efectos genotóxicos de diversos agroquímicos sobre especies de anfibios (Bly y col. 2004; Lajmanovich y col. 2005; Cabagna y col. 2006; Bosch y col. 2011). Sin embargo, pocos estudios han sido realizados con poblaciones de anfibios que habitan agroecosistemas, en los que se analizan los individuos en su ambiente natural. Este tipo de estudios suponen una visión más realista, porque contemplarían algunos fenómenos ambientales tales como la biodisponibilidad o la bioacumulación de los compuestos presentes en el ambiente en comparación con los ensayos en laboratorio (Djomo y col. 2000). Las poblaciones de anfibios que se reproducen en las charcas agrícolas pueden estar expuestos a un amplio rango de productos químicos, con diversos efectos en los individuos, tanto morfológicos como genéticos o fisiológicos (Cabagna y col. 2005; 2006; Lajmanovich y col. 2010; Peltzer y col. 2011; Bionda y col. 2012a). Para evaluar el riesgo potencial de poblaciones naturales a diferentes exposiciones ambientales, son utilizados biomarcadores (Hoffman y col.

2003). En general se distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de efecto (Silbergeld y Davis, 1994). Entre dichos biomarcadores, uno de los más utilizados es el test de micronúcleos, el cual constituye un biomarcador de efecto temprano de daño genético tanto en humanos (Lucero y col. 2000; Zalacain y col. 2005), como en plantas y animales (Djomo y col. 2000; Palma Acuña 2005; Junín y col. 2008; Arslan y col. 2009; Pollo y col. 2012). En este sentido, los agroquímicos pueden producir daño cromosómico mediante la formación clastogénica o aneugénica de micronúcleos (Bly y col. 2004; Lajmanovich y col. 2005; Cabagna y col. 2011). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar y comparar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes con distinto grado de alteración ambiental de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba.

MATERIAL Y MÉTODOS

Áreas de estudio

La Ciudad de Río Cuarto se ubica en una zona agrícola-ganadera. Se escogieron cuatro sitios, tres de ellos constituyen ambientes urbanos y periurbanos con distintos tipos y grados de alteración ambiental. La importancia en la selección de dichos ambientes para el presente estudio, se basa en los antecedentes de estudios previos sobre modificaciones en los parámetros poblacionales en distintas especies de anfibios, así como cambios en las propiedades de las comunidades, posiblemente por el grado de alteración ambiental (Bionda y col. 2011a, 2011b; Bionda y col. 2012a, 2012b; Pollo y col. 2012; Bionda y col. 2013). Uno de los sitios es un lago urbano, Lago Villa Dálcar (S 33°07' - W 64°20'), este constituye un ambiente artificial de aproximadamente 8 ha, rodeado por residencias (Mancini y col. 2012; Pollo y col. 2012). Dos sitios de cultivos ubicados en los alrededores de la ciudad y que se encuentran rodeados de una matriz agrícola, principalmente por cultivos de soja (*Glicine max* Merrill L). Uno de los cultivos fue denominado Cultivo 1 (S 33°05' - W 64°26') que cuenta con 9 ha y presenta cultivos a escasos metros del cuerpo de agua (15 m aproximadamente); y un Cultivo 2 (S 33°05' - W 64°25') de 5 ha que no presenta un cultivo cercano a los cuerpos de agua pero existen cultivos aledaños y recibe corrientas de agua proveniente de éstos. En ambos cultivos existe además

la práctica ganadera. El último sitio, utilizado como control, es un área ubicada en las sierras de Comechingones, Campo Experimental Las Guindas (S 32°04' - W 64°42'), perteneciente a la Universidad Nacional de Río Cuarto, cuenta con 1.200 ha y está ubicado a 90 kilómetros al noroeste de la ciudad de Río Cuarto. La región en la que se encuentra ubicado este ambiente presenta un 95,8% de géneros florísticos autóctonos, siendo considerada un área poco alterada (Natale, 1999; Vischi y col. 1999). De este modo, en un gradiente de mayor a menor alteración, ubicaríamos a los sitios Cultivo 1 y Cultivo 2 con mayor grado, asociado a la práctica agrícola-ganadera; el sitio Lago Villa Dálcar con una alteración media y de características urbanísticas; y por último el sitio Las Guindas, con escaso grado de alteración.

Metodología de campo y laboratorio

La especie *Bufo arenarum* tiene una distribución neotropical (Frost 2009). En Argentina presenta una amplia distribución, siendo encontrado en una variedad de hábitats, incluyendo ambientes costeros, zonas rurales o urbanas (Lajmanovich y col. 2010). Los individuos son principalmente más activos en los meses de octubre-diciembre, es decir, durante la primavera y el comienzo del verano (Bionda 2011). Debido a su amplia distribución y abundancia, esta especie es usada ampliamente para estudios ecológicos, fisiológicos, anatómicos y toxicológicos (Cabagna y col. 2005; Brodeur y col. 2008; Lajmanovich y col. 2010; Bionda y col. 2011a; 2012a, 2012b).

La captura de los ejemplares fue hecha a través de trampas de caída y relevamientos por encuentros visuales (Heyer y col. 1994). Se colectaron ocho individuos machos adultos por sitio, entre septiembre y diciembre de 2010. A cada individuo se le extrajo sangre de la vena angularis inmediatamente después de la captura (Nöller 1959). Se realizaron dos extendidos por cada individuo, se dejaron secar al aire por 24 hs, luego se fijaron con metanol por 20 minutos y se colorearon con Giemsa al 5% durante 10 minutos (Junín y col. 2008). La frecuencia de aparición de micronúcleos se cuantificó para 4000 células por individuo, utilizando un microscopio Carl Zeiss trinocular Primo Star (Pack 5). Se tomaron fotografías con cámara Canon Power Shot G10 14.7 Megapíxeles utilizando el Software AxioVision CARL ZEISS Versión 4.3. Existen ciertos criterios para el reconocimiento de micronúcleos:

el diámetro del micronúcleo debe oscilar entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal y debe estar separado de éste, debe haber una identificación clara del límite nuclear, no debe ser más refractivo y debe tener un color e intensidad como la del núcleo principal o mayor, su forma puede ser esférica u oval y debe estar incluido en el citoplasma celular (Schmid 1975; Fenech 2000; Zalacain y col. 2005). Se utilizó un análisis Kruskal-Wallis para corroborar si existían diferencias en la frecuencia de micronúcleos entre sitios.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se indican las medias y desvíos estándar registrados en la frecuencia de micronúcleos para cada uno de los sitios estudiados. Hay diferencias estadísticamente significativas entre los sitios en las frecuencias de micronúcleos (Kruskal-Wallis, $p = 0,0023$). La frecuencia de micronúcleos registrada en los individuos capturados en el sitio control Las Guindas son menores a las registradas en los restantes sitios. Además en el sitio control se encontraron eritrocitos en división en el 37,5% de los individuos. Entre los sitios modificados se registra una frecuencia de micronúcleos semejante, sin embargo, está es algo mayor en los sitios Cultivo 1 y Lago Villa Dálcar, seguido por el Cultivo 2. En la Figura 1 se muestran fotos de micronúcleos registrados en los distintos ambientes y los eritrocitos en división pertenecientes a los individuos del sitio Las Guindas.

DISCUSIÓN

La frecuencia de micronúcleos es un biomarcador de efecto, que puede reflejar la exposición temprana a un contaminante (Bly y col. 2004). Por tal motivo, los estudios realizados en poblaciones que habitan ambientes con distintos tipos de alteraciones (agrícolas y urbanas) son útiles para conocer la relación entre los organismos y su medio y, con ello, la salud del ambiente (Hoffman y col. 2003). Los resultados muestran que el número de micronúcleos encontrado en los individuos de los sitios alterados (Lago Villa Dálcar, Cultivo 1 y Cultivo 2; ver Tabla 1) es mayor al registrado en el sitio control ($0,17 \pm 0,23$; Tabla 1) y al propuesto como número basal para la especie ($0,30 \pm 0,09$) (Bosch y col. 2011). De esta manera, los resultados obtenidos podrían indicarnos que existiría cierto grado de inestabilidad genética en las poblaciones de *B. arenarum*

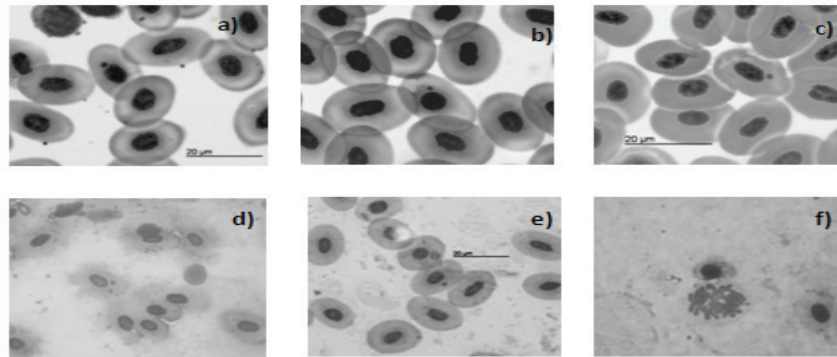


Figura 1. Micronúcleos registrados en individuos de: a) y b) Villa Dálcar; c) Las Guindas; d) Cultivo 1; e) Cultivo 2 y f) Células en división en individuos de Las Guindas.

Tabla 1. Frecuencia de micronúcleos en *B. arenarum* para los cuatro sitios de muestreo.

Sitio	n	Micronúcleos (Mn)
		%
Las Guindas	8	0,17 ± 0,23
Cultivo 1	8	0,78 ± 0,28
Cultivo 2	8	0,61 ± 0,45
Villa Dálcar	8	0,76 ± 0,47

n=Tamaño de la muestra, % = Frecuencia en mil

presentes en los sitios analizados, y que estos ambientes representarían un ambiente hostil para las poblaciones que allí habitan.

El lago Villa Dálcar se encuentra dentro del ejido urbano de la ciudad y constituye una importante área de recreación y pesca. En los últimos años se han registrado episodios de contaminación por escorrentías provenientes de campos cultivados (Mancini y col. 2000), como también un afloramiento algal (Novoa 2006) e inestabilidad genética en poblaciones de peces (Pollo y col. 2012). Recientemente, un estudio realizado por Bionda y col. (2012b) con poblaciones de *B. arenarum* ha demostrado una frecuencia alta de individuos con anomalías morfológicas. De esta manera, con los resultados obtenidos en el presente estudio sumado a las observaciones realizadas en los estudios de anomalías morfológicas por Bionda y col. (2012b) y considerando la importancia socioeconómica del lago, se podrían plantear serios cuestionamientos sobre la salud y calidad de este ambiente, y la necesidad de un monitoreo exhaustivo. Por su

parte, los sitios Cultivo 1 y Cultivo 2, también mostraron una frecuencia de micronúcleos considerablemente más alta a la registrada en el sitio control, y a la considerada basal para la especie. El hecho de que estos ambientes se encuentren rodeados de una matriz agrícola, supone un grado de alteración y posible degradación ambiental. Estudios realizados sobre la ecología y demografía de poblaciones de *B. arenarum* y otras especies de anfibios, también han mostrado indicios de una posible degradación ambiental en dichos cultivos (Bionda y col. 2011a; 2011b; 2012a). Estos resultados indicarían la necesidad de nuevas investigaciones sobre aspectos ecotoxicológicos y de un monitoreo más prolongado en el tiempo para estos ambientes, incluyendo, por ejemplo, otros tipos de biomarcadores, así como otras posibles especies representativas de la región.

Finalmente, el presente trabajo permitió ampliar el conocimiento sobre esta especie y sus efectos poblacionales por habitar ambientes antropizados. Además, los estudios con una especie como *B. arenarum*, la cual presenta una amplia distribución y es registrada en una variedad de ambientes, brindarían una herramienta eficaz para medir la calidad de distintos ambientes.

Agradecimientos: este trabajo fue realizado con el financiamiento del programa PPI 18/C416 de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Altieri M., Pengue W.GM soybean: Latin America's new colonizer. [en línea]. Seedling January issue. 2006. [Consulta 10 de abril de 2007]. Disponible en: <http://www.grain.org/ar>

ticle/entries/588-gm-soybean-latin-america-s-new-colonizer.

Arslan Ö.Ç., Parlak H., Katalay S., Boyacioglu M., Karaaslan M.A., Guner H. Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 2009;165:55-66.

Beebee T.J.C., Griffiths R.A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biol. Conserv.* 2005;125:271-285.

Bionda C. Dinámica poblacional de anfibios asociados a cultivos extensivos de la provincia de Córdoba, Argentina. Tesis de Ph.D., Universidad Nacional de Río Cuarto. 2011.

Bionda C., Lajmanovich R., Salas N., Martino A., di Tada I. Reproductive Ecology of the Common South American Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive Effort, Clutch Size, Fecundity, and Mate Selection. *J. Herp.* 2011a;45:261-264.

Bionda C., diTadal., Lajmanovich R. Composition of amphibian assemblages in agroecosystems from the central region of Argentina. *Russ. J. Herpetol.* 2011b;8:93-98.

Bionda C., Gari N., Luque E., Salas N., Lajmanovich R., Martino A. Ecología trófica en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) en agroecosistemas y sus posibles implicancias para la conservación. *Rev. Biol. Trop.* 2012b;60(2):771-779.

Bionda C., Salas N., Caraffa E., Baraquet M., Martino A. On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from central Argentina. *Herpetology Notes* [en línea]. 2012a Jun. [Consulta 12 de agosto de 2012]; 5:237-241. Disponible en: <http://www.herpetologynotes.seh-herpetology.org/contents5.html>.

Bionda C., Lajmanovich R., Salas N., Martino A., di Tada I. Demografía poblacional en *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) y *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leiuperidae) en agroecosistemas de la provincia de Córdoba, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* En prensa.

Bly B.L., Knutson M., Sandheinrich M., Gray

B., Jobe D. Flow cytometry used to assess genetic damage in frogs from farm ponds. *Journal of the Iowa Academy of Science.* 2004;11:67-70.

Bosch B., Mañas F., Gorla N., Aiassa D. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences.* 2011;3(6):155-163.

Brodeur J.C., Svartz G., Perez-Coll C., Marino D., Herkovits J. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology.* 2008;91:161-170.

Cabagna M., Lajmanovich R., Stringhini G., Sanchez Hernandez J.C., Peltzer P. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology.* 2005;2:373-380.

Cabagna M., Lajmanovich R., Peltzer P., Attademo A., Ale E. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 2006;88:729-737.

Cabagna M., Lajmanovich R., Attademo A., Peltzer P., Jungues C., Biancuccil G., Basso A. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae*. (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 2011;59(1):17-28.

Collins J.P., Crump M. *Extinction in Our Time.* Oxford University, Nueva York, Nueva York, EEUU, 2009.

Djomo J.E., Ferrier V., Békaert C. Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet Test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 2000;65:168-174.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research.* 2000;455:81-95.

Frost, D.R. *Amphibian species of the world.*

New York: American Museum of Natural History. [en línea]. 2009. [consulta 23 de febrero 2009]. Disponible en: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>.

Global Amphibian Assessment (GAA) Summary of key findings. [en línea]. Amphibian Specialist Group [Consulta 10 de abril de 2007]. Disponible en: <http://www.globalamphibians.org>.

Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmid R.W., Hayek L.C., Foster M.S. Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians. Eds Washington, Smithsonian Institution Press, 1994.

Hoffman D., Rattner B., Burton J.R.G., Cairns J.R.J. Handbook of Ecotoxicology, 2nd ed. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 2003.

Junín M., Rodríguez Mendoza N., Heras M.P., Braga L. Valoración preliminar de la utilización de biomarcadores de contaminación en algunas especies de peces del delta del río Paraná, Argentina. Las Ciencias, Revista de la Universidad Maimónides. 2008;01:17-24.

Lajmanovich R., Cabagna M., Peltzer P., Stringhini G., Attademo A. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. Mutation Research. 2005;587:67-72.

Lajmanovich R., Peltzer P., Junges C.M., Attademo A., Sanchez L.C., Bassó A. Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River flood plain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010;73:1517-1524.

Lucero L., Pastor S., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. Mutation Research. 2000;464:255-262.

Mancini M., Rodríguez C., Finola M., Basualdo C., Prospero C. Mortandad de peces en un lago recreacional del Sur de Córdoba, Argentina. Revista Aquatic. 2000;11:1-7.

Mancini M., Crichigno S., Ortiz M., Haro J.G. Lagos urbanos: importancia, dinamismo y multiplicidad de usos. El caso del Lago Villa Dalcar (Córdoba, Argentina). Biología Acuática. 2012;27:175-189.

Natale E. Status de conservación de especies vegetales que ocurren en la sierra de Comechingones. Tesis de grado Universidad Nacional de Río Cuarto. 1999.

Nöller H.G. Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. Pflügers Arch. Physiol. 1959;269:98-100.

Novoa M.D., Luque M.E., Lombardo D.L., Martínez de Fabricius A.L. Estudio Ficológico de lagos urbanos artificiales del sur de la provincia de Córdoba. Bol. Soc. Argent. Bot. 2006;41:203-231.

Palma Acuña P.S. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén. Tesis de Grado. Universidad Católica de Temuco. Chile. 2005.

Peltzer, P.M., Lajmanovich R.C., Sanchez L.C., Attademo A.M., Junges C.M., Bionda C.L., Martino A.L., Bassó A. Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. Herpetol. Conserv. Biol. 2011;6:432-442.

Pengue W.A. Transgenic crops in Argentina: the ecological and social debt. Bull. Sci. Technol. Soc. 2005;25:314-322.

Pollo F.E., Salas N.E., Mancini M.A., Martino A.L. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. Acta Toxicol. Argent 2012;20:64-70.

Rossi R.L. Impactos recientes de la soja en la Argentina. Panorama productivo del cultivo. Agromercado, Cuadernillo Clásico. 2006;129:4-7.

Schmid W. The micronucleus test. Mutation Research. 1975;31:9-15.

Silbergeld E.K., Davis D.L. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clinical Chemistry* 1994;40:1363-1367.

Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L., Waller R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 2004;306:1783-1786.

Vischi N., Oggero A., Arana M. Estudio previo al establecimiento de la reserva florística "Las Guindas". *Rev.UNRC*. 1999: 19: 37-55.

Young B.E., Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Boucher T.M. Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo. *Nature Serve*, Arlington, Virginia. 2004.

Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005;28:227-236.

Investigamos

Desarrollamos

Creamos

con Innovación

En Laboratorios Bagó trabajamos diariamente en la búsqueda de nuevas respuestas terapéuticas para ofrecer al cuerpo médico y pacientes, productos innovadores de última generación. 71 patentes obtenidas por investigación propia son fieles testimonios de nuestra misión.

 **Bagó**

Ética al servicio de la salud

Prevalencia de tabaquismo en el personal del Hospital Santojanni Prevalence of cigarette smoking among Santojanni Hospital's staff

Álvarez Bernárdez, Alejandra Marta; Delgado, Ana Laura; Ripoli, Mario†; Nápoli, Mónica*

Hospital Donación F. Santojanni. Pilar 950, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina (1408).

*manapoli@intramed.net

Recibido: 27 de julio de 2012

Aceptado: 27 de noviembre de 2012

Versión final recibida: 29 de agosto de 2013

Resumen. El tabaquismo es la principal causa de morbi-mortalidad prevenible en países en vías de desarrollo, de manera que se lo considera un grave problema en Salud Pública. El objetivo de este trabajo fue estimar la prevalencia de tabaquismo en el personal del Hospital Santojanni y compararla con la población general de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se realizaron encuestas anónimas y voluntarias, entre junio y noviembre del 2011. El diseño del estudio es observacional, descriptivo y analítico de corte transversal. Los resultados arrojaron que la prevalencia de tabaquismo en el personal del Hospital Santojanni es del 28,86% sin diferencias significativas con respecto a la población general de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (31,9%) ($p=0,0966$). En cambio, esta diferencia es significativa si se compara la prevalencia de tabaquismo en médicos (22,58%) con la comunidad ($p=0,0064$).

Palabras clave: Tabaquismo; Prevalencia; Personal Hospital Santojanni; Humo del tabaco.

Abstract. Tobacco smoking is the largest preventable cause of morbid-mortality in third world countries, so it is considered a major problem in Public Health. The aim of this research was to evaluate the prevalence of cigarette smoking among Santojanni Hospital's staff. Anonymous and volunteer surveys were achieved from June through November 2011. The study design was observational, descriptive and analytical cross-sectional. The prevalence of tobacco smoking at Hospital Santojanni staff was 28.86% without significant differences compared to CABA's (Ciudad Autónoma de Buenos Aires) general population (31.9%) ($p=0.0966$). On the contrary, this difference is significant if the prevalence of smoking in physicians (22.58%) was compared with the prevalence in the community ($p=0.0064$).

Keywords: Cigarette smoking; Prevalence; Staff Hospital Santojanni; Tobacco smoke.

INTRODUCCIÓN

El consumo de tabaco es la primera causa prevenible de muerte prematura y enfermedad en todo el mundo. En la actualidad, es responsable de más de 6 millones de decesos por año, y se estima que para el 2030 causará más de 7,5 millones de muertes anuales, de manera que se lo considera un grave problema en salud pública (Alwan y col. 2011)

Existen más de cuatro mil componentes del humo del tabaco. Unos 400-500 se hallan en fase gaseosa (como óxido de nitrógeno, monóxido de carbono, amoníaco, aldehídos, cetona) y el resto en forma particulada (como la nicotina, agua y alquitrán, hidrocarburos, metales y fenoles) Al menos 43 de ellas tienen efectos carcinogénicos comprobados (Hoffmann y Hoffmann 1997)

El fumar tabaco tiene efectos en el ser humano en múltiples sistemas del organismo. Se sabe que su consumo de tabaco además ser carcinógeno, Grupo I (según la IARC), aumenta el riesgo de eventos trombóticos y de genera un importante gasto en salud por parte del Estado. Sólo uno de cada 10 fumadores puede abandonar el hábito, lo que resulta menos exitoso que el cese del consumo de cocaína (Bergman y col. 2010).

Distintos estudios epidemiológicos concluyen que: La razón global de mortalidad para fumadores es de 1,7 respecto a los que no fuman. La expectativa de vida se ve considerablemente reducida por el hábito tabáquico. El riesgo es proporcional al número de cigarrillos diarios y al tiempo de duración del hábito, además de depender del contenido de nicoti-

na y de alquitrán (Barrueco y col. 1996). El humo ambiental proviene de la combustión espontánea del cigarrillo, el procedente de la corriente principal cuando el fumador la exhala total o parcialmente hacia el ambiente y el procedente de la combustión espontánea (corriente secundaria). Esta última contiene hasta 3 veces más nicotina y alquitrán, 5 veces más CO, además de concentraciones sensiblemente superiores de acroleína, amoníaco, nitrosaminas y óxidos de nitrógeno, confiriéndole una mayor concentración de cancerígenos que en la corriente principal (Wynder y Hoffmann 1979, 1994). Desde el punto de vista fisiopatológico, los componentes tóxicos del humo del tabaco pueden agruparse en carcinógenos, nicotina, CO, irritantes, tiocinatos y radicales libres, como los óxidos de nitrógeno, las olefinas y los dienes.

El fumador pasivo tiene un riesgo de mortalidad de 1,5 mayor a la población que no está expuesta al humo del tabaco (Müller 2006).

En Argentina, la tendencia epidemiológica es la estabilidad de prevalencia del consumo de tabaco, con un aumento significativo en zonas urbanas. También se observa inicio y mayor consumo en grupos etarios de menor edad, entre otras causas, por su fácil acceso. A la vez, que la incidencia de consumo de tabaco en las mujeres va en aumento.

A pesar que hace más de cincuenta años se conocen los daños que genera el consumo de tabaco en la salud, recién en los últimos diez años comenzaron a comprenderse los mecanismos neurobiológicos por los cuales se genera adicción al tabaco, permitiendo el desarrollo de nuevos tratamientos para lograr la cesación, llevando a que, como afirma Müller, "la investigación le deba al tabaquismo y a la salud pública años de dedicación seria".

Para prevenir las devastadoras consecuencias del tabaquismo, es necesario el trabajo conjunto de diversas disciplinas y actores, como el personal de salud, la Salud Pública, la investigación básica y la sociedad en su conjunto.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del "Convenio Marco para el Control del Tabaco" del año 2003, propone el trabajo conjunto de distintos países a través de planes de acción ajustados a su legislación, para reducir la tasa de morbimortalidad causada por el tabaco.

La OMS promueve en forma prioritaria que el personal de salud deje de fumar, puesto que

desempeña un rol importante en materia sanitaria. Además genera un impacto sobre el cese del consumo en la comunidad que deben educar, reconociendo el consumo de tabaco como una enfermedad crónica, informando sobre los riesgos por consumo y motivando el abandono del mismo.

Los profesionales que consumen tabaco se sienten menos estimulados a promover acciones de cesación tabáquica sobre sus pacientes.

Objetivos de este trabajo:

- Estimar la prevalencia del consumo de tabaquismo en el personal del Hospital Santojanni y compararlo con el parámetro.
- Conocer la opinión sobre la exposición ambiental al humo de tabaco dentro y fuera del ambiente de trabajo.
- Evaluar el conocimiento de la Ley 3.718/10 de la CABA, que prohíbe fumar en Instituciones de Salud.
- Estimar qué porcentaje está de acuerdo con que el hospital debe ser una Institución libre de humo de tabaco.
- Estimar qué porcentaje está pensando dejar de fumar en los próximos treinta días a seis meses y cuántos de ellos recibirían o no ayuda del consultorio de tabaquismo del hospital.

MATERIAL Y MÉTODOS

La población de estudio es el personal del hospital Santojanni, con un total de 2.500 individuos.

Durante los meses de junio-noviembre de 2011 se realizaron encuestas anónimas y voluntarias integradas con preguntas de opción múltiple, previamente validadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en todas las áreas de servicio del Hospital Santojanni y Cesac Nro. 5. (Centro de Salud y Acción Comunitaria).

Las variables fueron establecidas como sigue:

- Profesión: nominal con las categorías correspondientes a la función.
- Hábito tabáquico: nominal con las categorías correspondientes a las definiciones de la OMS.
- Género: dicotómica.
- Tipo de diseño de estudio: observacional, descriptivo y analítico de corte transversal.
- Criterios de inclusión: personal con dependencia laboral del Hospital Santojanni, cualquiera sea su tipo.
- Criterios de exclusión: negativa a participar en el estudio.

-Tamaño y tipo de población: se realizaron 704 encuestas sobre una población de 2.500 individuos, de las cuales resultaron evaluables 648 a través de un muestreo no aleatorio de conveniencia para un tamaño muestral necesario de 295 encuestas. El muestreo no fue ponderado.

Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Santojanni. El consentimiento de los encuestados fue obtenido en forma oral, previa información y comprensión de los alcances del estudio.

Análisis estadístico

Toda la información recogida se ingresó a una base de datos creada con Microsoft Office

Excel®. Se realizó el análisis de la misma a través de tablas dinámicas. Se elaboraron tablas de distribución para una mejor valoración estadística. Se realizaron los cálculos con el programa Statistix®.

El tamaño del efecto se calculó mediante la razón de prevalencias (RP) con su intervalo de confianza 95% (IC 95%) y la significación mediante el Estimador Z para comparación de proporciones.

La prevalencia de tabaquismo en la población general se asumió como parámetro sobre el cual realizar las inferencias. Se estableció significación estadística para un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

De 648 encuestas analizadas se obtuvieron los resultados que se muestran en las *Tablas 1 a 3*.

Tabla 1. Resultados de las encuestas del hospital Santojanni. Cantidad de fumadores y prevalencia de tabaquismo en las distintas categorías correspondientes a la función del personal del hospital.

Prevalencia de tabaquismo		Cantidad fum/total	%	Intervalo de confianza (%)
Hospital Santojanni	Médicos	42/185	22,7	16,7-28,7
	Enfermeros	27/101	26,73	18,1- 35,4
	Personal Sanitario	85/370	22,97	18,7-27,3
	Otro Personal	94/244	38,52	32,4-44,6
	Fumadores	179/614	29,15	25,6-32,7
	Nunca Fumadores	250/614	40,72	36,8-44,6
	Experimentadores	69/614	11,24	8,7-13,7
	No Fumadores	425/614	69,22	65,6-72,9
	Ex Fumadores	111/614	18,08	15,0-21,1
	Mujeres Fumadoras	113/401	28,18	23,8-32,6
Hombres Fumadores	66/213	30,99	24,8-37,2	

Tabla 2. Prevalencia de tabaquismo en Argentina y en Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

CABA 2005	Comunidad	31,9
Argentina	Mujeres	37,7
	Hombres	39,7
	Médicos ¹	30

¹Zylbersztejn y col. 2007.

Tabla 3. Resultados de las encuestas del Hospital Santojanni y del Hospital Posadas. Comparación estadística de la prevalencia de tabaquismo en las distintas categorías correspondientes a la función del personal de cada hospital.

	Hospital Santojanni %	Hospital Posadas %	p
Médicos	22,7	24	0,679
Enfermeros	26,73	31	0,354
Personal de salud	22,97	27	0,08
Otro personal	38,52	-	
Fumadores	29,15	32	0,130
No fumadores	69,22	52	<0,001
Ex fumadores	18,08	16	0,160
Mujeres fumadoras	28,18	29	0,717
Hombres fumadores	30,99	35	0,219
Humo del cigarrillo es perjudicial para la salud	99,19	94	
El humo del cigarrillo en el ambiente de trabajo les resulta molesto	78,34	77	
Conocen la ley que prohíbe fumar en centros de salud.	93,97	86	
Tienen intención de dejar de fumar en los próximos 30 días a 6 meses	48,6	54	
Aceptarían ayuda	81,61	82	
No piensan en dejar de fumar	51,4	43	
Piensan que el hospital debe ser una institución libre de humo.	97,39	-	

Si comparamos la prevalencia de tabaquismo del Hospital Santojanni (28,86%) con la de la comunidad (31,9%), se observa que la diferencia no es significativa ($p=0,0966$). *Figura 1*. Al analizar la diferencia de prevalencia de tabaquismo entre médicos y enfermeros del hospital, se observó que la diferencia no es estadísticamente significativa, ya que $p=0,2632$. Tampoco se comprueba asociación entre profesión y hábito tabáquico. $RP = 1,2$; $IC95\%: 0,797 - 1,807$.

Si se compara la prevalencia de tabaquismo entre enfermeros y la comunidad tampoco se observó diferencias significativas, $p=0,287$.

En cambio, si se compara la prevalencia de tabaquismo entre médicos y la comunidad se evidencia una $p=0,0064$, de manera que la diferencia en este caso es significativa.

Al comparar los resultados obtenidos en el Hos-

pital Santojanni con los del Hospital Posadas, no se observan diferencias significativas en: la prevalencia de tabaquismo ($p=0,0864$); la prevalencia de tabaquismo en médicos ($p=0,6504$), enfermeros ($p=0,3834$) y personal de salud ($p=0,0916$); la prevalencia de ex fumadores ($p=0,0803$), mujeres fumadoras ($p=0,6717$) y hombres fumadores ($p=0,1452$) (*Figura 2*).

Al comparar la prevalencia de no fumadores en el Hospital Santojanni y el Hospital Posadas, la diferencia es altamente significativa ($p<0,001$).

El 20,86% de los tabaquistas piensa en dejar de fumar en los próximos 30 días, el 28,34% en los próximos 6 meses y el 50,8 % no piensan en dejar de fumar (*Figura 3*)

De los que desean dejar de fumar (49,20%), el 80,43% aceptaría ayuda del consultorio de tabaquismo del hospital (*Figura 4*).

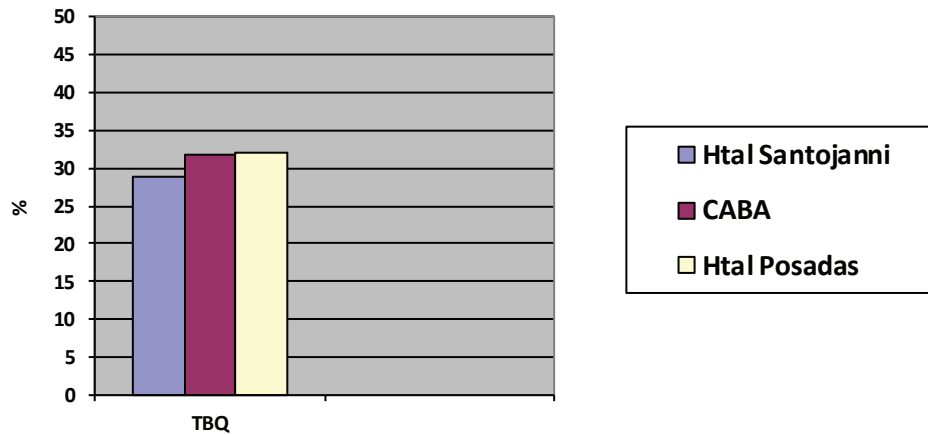


Figura 1. Comparación de la prevalencia de tabaquismo del hospital Santojanni y la comunidad.

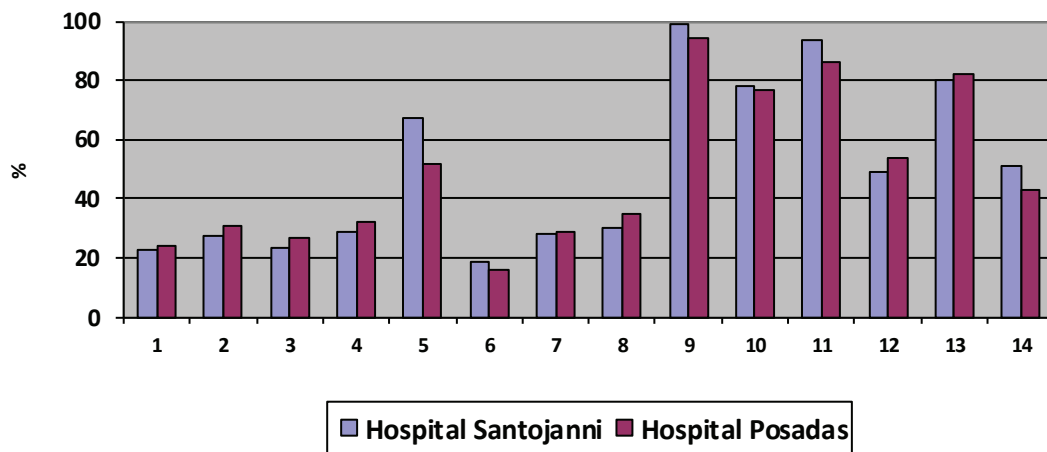


Figura 2. Comparación de los resultados obtenidos del Htal. Santojanni y del Htal. Posadas.

(1) Médicos fumadores, (2) Enfermeros fumadores, (3) Personal de salud fumadores, (4) Fumadores, (5) No fumadores, (6) Ex fumadores, (7) Mujeres fumadoras, (8) Hombres fumadores, (9) La exposición ambiental al humo del tabaco es perjudicial para la salud, (10) Les molesta el humo de tabaco en el ambiente de trabajo, (11) Conoce la ley que prohíbe fumar en instituciones de salud, (12) Tienen intención de dejar de fumar en 1-6 meses, (13) Aceptarían ayuda de consultorio de tabaco, (14) No piensan dejar de fumar.

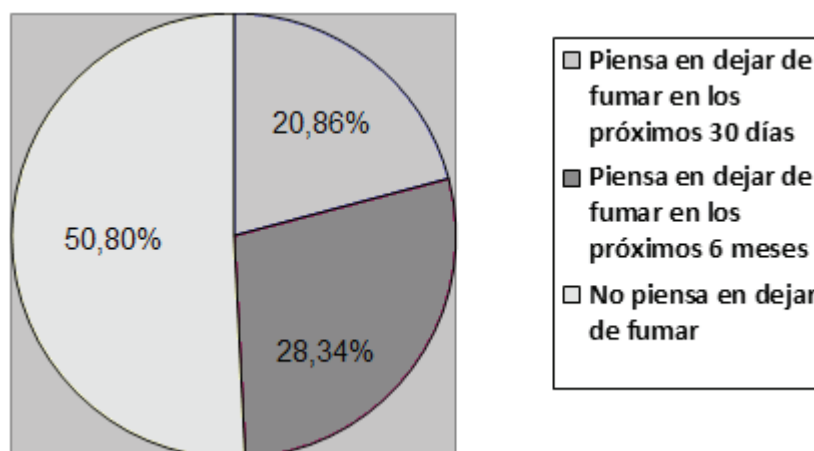


Figura 3. Porcentaje de tabaquistas que no piensan dejar de fumar y porcentaje de tabaquistas que piensan dejar de fumar en los próximos 30 días y 6 meses.

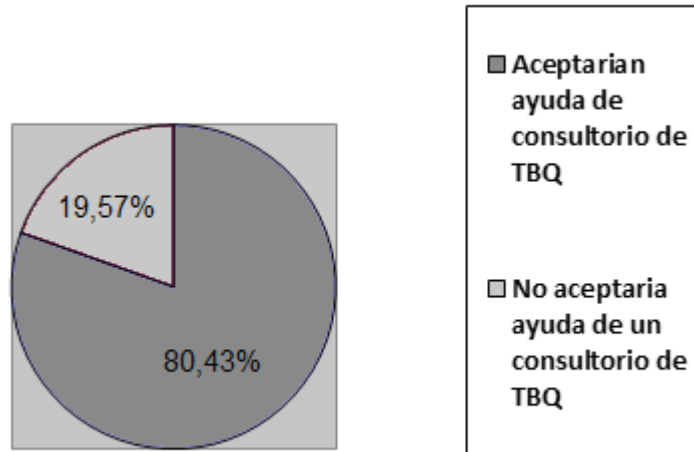


Figura 4. Porcentaje de tabaquistas que aceptaría ayuda de un profesional para dejar de fumar, las que piensan dejar de fumar en los próximos 30 días y 6 meses.

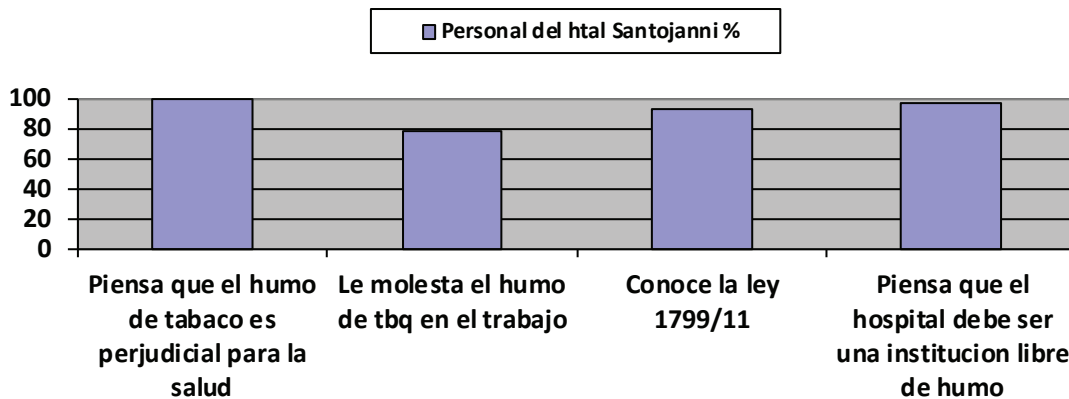


Figura 5. Consideraciones sobre el humo de tabaco.

Al interrogar sobre el daño que causa el humo del tabaco en fumadores pasivos, el 99,07% respondió que es perjudicial para la salud. Por otro lado al 77,93% le molesta el humo de tabaco en el ambiente de trabajo, un 93,52% conoce la existencia de la Ley antitabaco 3.718/10 que prohíbe fumar en Instituciones de Salud y el 97,38% está de acuerdo que el hospital debe ser una institución libre de humo de tabaco (Figura 5)

La mayoría piensa que la exposición ambiental del humo de tabaco es perjudicial para la salud, sin embargo al 22,07% no le molesta

el humo de tabaco en el ambiente de trabajo y un 2,62% no está de acuerdo que el hospital sea una institución libre de humo.

DISCUSIÓN

Comparando la prevalencia de tabaquismo entre médicos y la comunidad se evidencia una $p=0,0064$, siendo la diferencia significativa.

Al comparar la prevalencia de no fumadores en el Hospital Santojanni (67,13%) y el Hospital Posadas (52%), la diferencia es altamente significativa ($p<0,001$).

Para lograr disminuir los índices de prevalen-

cia es indispensable contar con información y vigilancia epidemiológica para dirigir medidas de control a través de políticas públicas y estrategias sanitarias que favorezcan la cesación tabáquica y la prevención primaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los encuestadores Analía V. Cozza, Gabriel Schiavon, Octavio Bertola.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Alwan A., Armstrong T., Bettcher D., Branca F., Chisholm D., Ezzati M., Garfield R., McLean D., Matterns C., Mendis S., Poznyak V., Riley L., Cho Tang K., Wild C. Enfermedades No Transmisibles y Salud Mental. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010, Resumen de Orientación, Organización Mundial de Salud (OMS), 2011.

Bergman G., Bianco E., Cohen M., Chatkin J.M., Gigliotti A., Gómez H., González J., Guerrero A., Montes de Oca M., Morales E., Issa J., Nicastrí S., Ponciano G., Posadas R., Salvador G., Sandoval R., Seijas E., Smith R., Viégas C.A., Zabert G. Terapia no farmacológica para dejar de fumar. En: Actualizaciones Latinoamericanas sobre prevención y tratamiento del tabaquismo [en línea]. 2010. [consulta: septiembre de 2011]. Disponible en: <http://www.alatorax.org/biblioteca-actual-alat/actualizaciones-latinoamericanas-sobre-prevencion-y-tratamiento-del-tabaquismo43>.

Barrueco Ferrero M., Hernández Mezquita M.A., Torrecilla García M. Manual de Diagnóstico y tratamiento del tabaquismo, Madrid, 1996.

Comité para un hospital libre de Humo de Tabaco. [en línea]. Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Argentina. [actualizada al 2011, consulta: septiembre 2011]. Disponible en: http://www.hospitalposadas.gov.ar/general/comites/c_sinhumo_fundam.htm.

Ley 3718/10. Ley de Control de Tabaco. [en línea]. Dirección General Centro Documental de Información y Archivo Legislativo. [actualizada al 13 de diciembre de 2010, consulta: septiembre 2011]. Disponible en: <http://www.cedom.gov.ar/es/legislacion/normas/leyes/ley3718.html>.

Hoffmann D., Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health*. 1997;50:307-64.

Müller F.W. Cesación Tabáquica, Tiempo de Intervenir. Ed. Polemos, Bs. As., Argentina, 2006.

Programa de Prevención y Control del Tabaquismo. [en línea]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: [actualizado al 2011, consulta: Septiembre 2011]. Disponible en: http://www.buenosaires.gov.ar/areas/salud/programas/tabaco/?menu_id=29570.

Programa Nacional de Control del Tabaco. [en línea]. Ministerio de Salud de la Nación Argentina [actualizado al 2005, consulta: septiembre 2011]. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/hm/site_tabaco/index.asp.

Wynder E.L., Hoffmann D. Smoking and lung cancer: challenges and opportunities. *Cancer Res*. 1994;54:5284-95.

Wynder E.L., Hoffmann D. Tobacco and health: a societal challenge. *N Engl J Med*. 1979;300:894-903.

Zylbersztejn H., Cardone A., Vanstein N., Mullasi A., Calderón J., Blanco P., Pautasso E., Picarel A., Cragolino R., Fernández S., Andina A., Saravia Toledo S., Torchio I., Belziti C.A. Tabaquismo en médicos de la República Argentina. Estudio TAMARA. *Rev Argent Cardiol* 2007;75(2):1-8.

**Acute silver toxicity to *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae)
in a river with extreme water-quality characteristics**
**Toxicidad aguda de la plata sobre *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae)
en un río con características extremas de calidad de agua**

Casares, María Victoria^{1*}; de Cabo, Laura I.¹; Seoane, Rafael^{2,3}; Natale, Oscar²

¹Bernardino Rivadavia National Museum of Natural History, Avenida Angel Gallardo 470 (C1405DJR), Buenos Aires, Argentina. Tel. 54 011 4982 4494; fax: 54 011 4982 0306. ²National Water Institute, Autopista Ezeiza-Cañuelas, Tramo Jorge Newbery km 1.62 (1802) Ezeiza, Buenos Aires, Argentina. ³Faculty of Engineering, University of Buenos Aires, Avenida Las Heras 2214 (C1127AAR), Buenos Aires, Argentina.

*mvc251@hotmail.com

Recibido: 12 de abril de 2013
Aceptado: 13 de agosto de 2013

Abstract. A 96 h acute silver toxicity test was performed in order to determine silver toxicity (LC_{50}) to a local fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) in a river with extreme water-quality characteristics (Pilcomayo River, South America) and evaluate a cross-fish-species extrapolation of the Biotic Ligand Model. The dissolved silver concentrations tested were 0.095, 0.148, 0.175 and 0.285 mg Ag L⁻¹. The 96 h Ag LC_{50} calculated for *C. decemmaculatus* was 0.14 mg L⁻¹ (0.18 - 0.10) and the value predicted by BLM for *Pimephales promelas* was 0.051 mg Ag L⁻¹. Test water elevated hardness may have exerted some protective effect. High mean water pH may have exerted a major protective effect by reducing silver free ion form and causing silver precipitation. The mortality pattern observed in this toxicity test may lend some support to a relationship between gill silver accumulation and mortality. A cross-fish-species extrapolation of Ag BLM for *P. promelas* was not valid in Pilcomayo River water and experimental conditions of this toxicity test.

Keywords: Silver; *Cnesterodon decemmaculatus*; Biotic Ligand Model; Extrapolation.

Resumen. Con el objeto de determinar la toxicidad de la plata en un pez nativo (*Cnesterodon decemmaculatus*), se llevó a cabo un ensayo estático de toxicidad aguda a 96 horas en un agua natural con características de calidad de agua, extremas (río Pilcomayo, Sudamérica). Asimismo, se evaluó una posible extrapolación inter-especie del Modelo del Ligando Biótico en el agua experimental. La concentración inicial de plata en solución en los distintos tratamientos fue de 0,095; 0,148; 0,175 y 0,285 mg Ag L⁻¹. La CL_{50} a las 96 horas calculada para *C. decemmaculatus* fue de 0,14 (0.18 - 0.10) mg Ag L⁻¹ y el valor predicho por el BLM para *Pimephales promelas* fue de 0,051 mg Ag L⁻¹. La elevada dureza del agua experimental pudo haber tenido algún efecto protector frente a la toxicidad de la plata. El valor medio de pH del ensayo fue elevado y posiblemente tuvo un gran efecto protector por reducción de la forma iónica libre y precipitación del metal. El patrón de mortalidad observado en este ensayo de toxicidad apoyaría la relación causa-efecto entre acumulación de plata en las branquias y mortalidad. La extrapolación inter-especie del BLM para *P. promelas* no resultó válida en el agua del río Pilcomayo y en las condiciones experimentales de este ensayo.

Palabras clave: Plata; *Cnesterodon decemmaculatus*; Modelo de Ligando Biótico; Extrapolación.

INTRODUCTION

Silver, as many other heavy metals enters the aquatic ecosystems as a by-product of many industrial and mining processes. Silver ion is one of the most toxic forms of a heavy metal, surpassed only by mercury and thus, it has been assigned to the highest toxicity class, together with cadmium, chromium (VI), copper and mercury (Ratte 1999). The primary effect of silver is on sodium and chloride uptake and efflux. When present as silver ni-

trate, silver is one of the most acutely toxic metals to freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 96-h LC_{50} values in the range of 6.5–13 $\mu\text{g L}^{-1}$ in freshwaters that are generally low in organic matter content. Silver nitrate is highly toxic because it readily dissociates in water to yield ionic silver (Ag^+), the most acutely toxic species of silver. Silver toxicity occurs in freshwater fishes as a result of Ag^+ disabling first the carbonic anhydrase and later the enzyme Na^+/K^+ adenosinetriphospha-

tase (ATPase) at the gill, leading to a net loss of sodium and chloride (Morgan et al. 2004). As a result, blood volume decreases and blood viscosity and pressure increase leading to fish mortality (Kennedy 2011).

The Biotic Ligand Model (BLM) (Di Toro et al. 2001) has been proposed as a tool to evaluate quantitatively the manner in which water chemistry affects the speciation and biological availability of metals in aquatic systems (Paquin et al. 2002). This model was developed using geochemical equilibrium principles, and provides site-specific toxicity predictions (Clifford and McGeer 2009). It is implicitly assumed that BLMs can be extrapolated within taxonomically similar groups, i.e., that BLMs developed for *P. promelas* can be applied to ecotoxicity data for other fish species, that BLMs for *D. magna* and *C. dubia* can be applied to ecotoxicity data for other invertebrates (Schlekat et al. 2010). The basis for a cross-species extrapolation is the assumption that the parameters, which describe interactions between cations (notably calcium, magnesium and protons), the toxic free metal ion (M^{n+}) and the biotic ligand are similar across organisms, and that only intrinsic sensitivity varies among species (Schlekat et al. 2010).

A variety of water chemistry factors can protect against metal binding to the sites of action of toxicity either by cationic competition (sodium and protons in the case of silver), or by anionic complexation (e.g., hydroxide, (bi) carbonate, chloride, thiosulfate, sulfide, and most importantly dissolved organic matter), thereby preventing it binding to the toxicity sites (Wood 2008). One of the first and most well recognized of the modifying factors for metals is water hardness. However, it appears to be less important for silver toxicity (Kennedy 2011). Alkalinity, on the other hand, affects metal ionic species in water solution through their complexation with carbonates (Erickson et al. 1996; Lauren and McDonald 1986) and dissolved organic matter forms complexes with metals, which reduces the free form in the water, and therefore the amount of ionic metal available to bind to the gill sites (Matsuo et al. 2004).

Pilcomayo River water is characterized by high concentration of sulphates, chloride, calcium, magnesium, and total suspended solids. Moreover, most of the major ions mean concentration in Pilcomayo River water is at the 95th percentile compared to the 60 largest riv-

ers in the world (data in Gaillardet et al. 1999). Toxic waste spills containing high concentrations of arsenic and heavy metals are released daily from the mining district of Potosí, in Bolivia into Pilcomayo River waters. Mining of the Cerro Rico de Potosí ores began in 1545 however, since the introduction of the Crushing-Grinding-Flotation method of mineral processing (1985) the chronic contamination of the Pilcomayo River water and sediments has increased steadily (Smolders et al. 2003).

Cnesterodon decemmaculatus (Pisces: Poeciliidae; Jenyns 1842) is an endemic member of the fish family Poeciliidae with extensive distribution in neotropical America. The species attains high densities in a large variety of water bodies within the entire La Plata River and other South American basins. *Cnesterodon decemmaculatus* is a small, viviparous, micro-omnivorous, benthic-pelagic, non-migratory fish. This species, highly tolerant to extreme environmental conditions, is additionally easy to handle and breed under laboratory conditions (Menni 2004). Thereby, several authors have used *C. decemmaculatus* in bioassays (de la Torre et al. 1997, 2002, 2005; Ferrari et al. 1998; Gómez et al. 1998).

Pimephales promelas (Pisces: Cyprinidae; Rafinesque 1820), one of the fish species for which BLM has been developed, is a temperate, holartic fresh water fish. As well as *C. decemmaculatus*, is quite tolerant to turbid, low-oxygenated water bodies, and can be found in muddy ponds and streams and in small rivers (<http://www.fishbase.org/summary/Pimephales-promelas.html>). There is one previous work on the toxicity of metals to *C. decemmaculatus* in Pilcomayo River water (Casares et al. 2012). The authors found that a cross-fish-species extrapolation of the Cu-BLM was valid within the Pilcomayo River water quality characteristics and experimental conditions of their toxicity test. With respect to Ag BLM, more work with a wider range of species will be required to improve its predictive capability (Bianchini et al. 2002).

The aim of this study was to evaluate a cross-fish-species extrapolation of the silver BLM in a river with extrem water-quality characteristics (Pilcomayo River water). In order to achieve this aim: (a) silver toxicity (96-h Ag LC₅₀) to *C. decemmaculatus* was assessed in Pilcomayo River water, (b) BLM, version 2.2.3 was applied to predict acute silver toxicity to *P. promelas* (Ag LC₅₀) under Pilcomayo River wa-

ter quality characteristics and (c) the predicted Ag LC₅₀ value for *P. promelas* was compared to the calculated for *C. decemmaculatus*.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The Pilcomayo River in South America is a tributary to the large La Plata system. Its head-

waters are located in Bolivia along the eastern flank of the central Andes at an elevation of approximately 5,200 m (Figure 1). The river flows in a southeasterly direction until reaching the Chaco Plains along Bolivia's southern border with Argentina. Its total length is 2,426 km and its basin covers an area of approximately 288,360 km² (<http://www.pilcomayo.net/web/>).



Figure 1. Map of Pilcomayo River basin with the water sampling location (Misión La Paz, Argentina)

Water sampling and chemical analysis

Discrete water samples for chemical analysis were taken 10 cm below the water surface and in triplicate from the navigation channel, left and right shore of Pilcomayo River in Misión La Paz International bridge (22° 22' 45" S – 62° 31' 08" W; 254 meters over sea level) in September 2009 (Figure 1). Water discharge (Q), pH and water temperature (T) were determined in situ. Dissolved concentrations of calcium (Ca), magnesium (Mg), chloride (Cl), potassium (K), sodium (Na), sulphate (SO₄), hardness (Hard), alkalinity (Alk), dissolved organic carbon (DOC), total suspended solids (TSS),

total dissolved solids (TDS), total (T. Ag) and dissolved silver (D. Ag) concentrations were determined using Standard Methods test protocols (APHA, AWWA, WPCF 1992).

Toxicity test

Water for the toxicity test was collected in pre-rinsed 10-L polypropylene containers. Samples were immediately placed into coolers and transported by plane to the laboratory. Later, water was centrifuged (2000 rpm during 15 minutes) and filtered through 47 mm, 0,45µm pore glass-fibre filters (Whatman GF/C). Dissolved silver background concentration in Pil-

comayo River water was below the method detection limit (ND).

Juvenile *C. decemmaculatus* were collected from a small pond, located in Reserva Natural Los Robles, Buenos Aires Province, Argentina (main chemical and physical parameters in Casares et al. 2012). Fish were kept at temperatures ranging from 20 to 24°C and pH ranging from pH 7.1 to 7.5 in an aquarium supplied with a continuous flow of aerated de-chlorinated tap water for 30 days. During this period and posterior laboratory and test water (centrifuged and filtered Pilcomayo River water) acclimation the fish were fed with a daily ration of commercial fish food. Acclimation to test water was performed by adding small quantities of test water to the aquarium until most of the water volume corresponded to test water. One day before and during the experiment, fish were not fed.

Toxicity effect of silver on fish was tested in static systems (4L glass aquaria) with continuous artificial aeration, constant environmental temperature and natural laboratory photoperiod. Test water volume in each aquarium was 2L. Test silver concentrations were attained by spiking from stock solutions of 200 mg Ag L⁻¹. The reagent-grade toxicants used to perform the stock solutions was AgNO₃ (Merck analytical grade).

To define the range of silver concentrations to be employed in the bioassay a nominal concentration of 1 mg Ag L⁻¹ was tested in an aquarium with 2L volume of Pilcomayo River water and 10 acclimated specimens of juvenile *C. decemmaculatus* for 96 h. Subsequently, the experimental design applied included different metal concentrations or treatments (T) with one control group (kept in test water and without metal addition). Fish (not sexed) taken from the acclimation tank were randomly distributed in the different experimental aquaria. Mean standard length of the specimens selected was 13.8 ± 1.2mm and each aquarium contained 10 specimens. Metal concentration in the experimental aquaria was adjusted prior to the fish transfer. Survival was registered four times a day during 96 h. Water pH, conductivity and dissolved oxygen were measured with portable probes from HANNA (HANNA instruments, Inc. Woonsocket, RI, USA) daily. At the beginning of the toxicity test, water samples were collected into polypropylene conical tubes and acidified to pH<2 with concentrated nitric acid (reagent-grade) for metal analysis.

Silver in samples was measured by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry Perkin Elmer AAnalyst 800 (Perkin Elmer, Inc. Waltham, MA, USA). Method detection limit was 0.008 mg L⁻¹.

LC₅₀ calculations

The median lethal concentration (LC₅₀) at 24, 48, 72 and 96 hours (24-h LC₅₀, 48-h LC₅₀, 72-h LC₅₀, 96-h LC₅₀) were calculated using PROBIT method (Finney 1978) and the statistical program StatPlus (Analyst Soft Inc.).

Version 2.2.3 of the BLM Windows Interface (available at http://www.hydroqual.com/wr_blm.html) was run in order to predict acute silver toxicity to *P. promelas* (toxicity mode). Pilcomayo River water quality parameters employed to run the BLM were temperature, pH, dissolved organic carbon, calcium, magnesium, sodium, potassium, sulphate, chloride and alkalinity.

Metal speciation

BLM (speciation mode) was also used to assess chemical speciation of the measured silver concentrations.

RESULTS

Water quality parameters of Pilcomayo River test water are shown in *table 1*.

Table 1. Test water main physicochemical parameters (data provided by Subsecretaría de Recursos Hídricos - Argentina). ND: not detected.

Parameter		
Q	m ³ s ⁻¹	19.3
pH	UpH	7.7
Ca	mg L ⁻¹	119
Mg	mg L ⁻¹	46.2
Cl	mg L ⁻¹	208
Na	mg L ⁻¹	143.9
K	mg L ⁻¹	12
SO ₄	mg L ⁻¹	364
DOC	mg L ⁻¹	3
Alk	mg L ⁻¹ CaCO ₃	142
Hard	mg L ⁻¹ CaCO ₃	485.16
T. Ag	mg L ⁻¹	ND
D. Ag	mg L ⁻¹	ND
TSS	mg L ⁻¹	546
TDS	mg L ⁻¹	945

Toxicity test mean water pH and temperature were 8.3 ± 0.2 and $25.1 \pm 1.2^\circ \text{C}$, respectively. Within the first few hours from the beginning of the toxicity test, a precipitate was observed. No mortality was observed in the control group. Initial exposure silver concentrations were 0.095 (T1), 0.148 (T2), 0.175 (T3) and 0.285 mg Ag L^{-1} (T4). Highest mortality was observed within the

first five hours in all treatments.

The median lethal concentrations (LC_{50} , mg L^{-1}) at 24, 48, 72 and 96 h (24-h LC_{50} , 48-h LC_{50} , 72-h LC_{50} , 96-h LC_{50}) with their corresponding confidence intervals (quoted) calculated using PROBIT method and the 96-h Ag LC_{50} predicted by BLM for *P. promelas* in the toxicity test water are shown in table 2.

Table 2. The LC_{50} at 24, 48, 72 and 96 hours (24-h LC_{50} , 48-h LC_{50} , 72-h LC_{50} , 96-h LC_{50}) with their respective confidence intervals calculated for *C. decemmaculatus* and the predicted 96-h LC_{50} by BLM for *P. promelas* in the test water.

LC_{50} (mg Ag L^{-1})				
24-h	48-h	72-h	96-h	BLM
0.21 (0.15-0.33)	0.17 (0.12-0.22)	0.15 (0.11-0.19)	0.14 (0.10-0.18)	0.051

Figure 2 shows calculated silver toxicity to *C. decemmaculatus* compared with predicted silver toxicity (LC_{50} , in $\mu\text{g Ag L}^{-1}$) using the Biotic Ligand Model. As it can be observed BLM prediction was not accurate within a factor of 2. BLM speciation output can be observed in figure 3. Silver speciation in the four treatments was practically the same with 60% of the silver as AgCl and 30% as AgCl_2 . The free ion form represented the highest contribution (6%) amongst the remaining species group.

DISCUSSION

Pilcomayo River water characterizes by its high water hardness. The ameliorative effects

of water hardness on copper toxicity have been well documented; whereas, its protective effect on silver toxicity seems to be not clear. For Paquin et al. (2002), when competing with silver at the biotic ligand, calcium tends to be of less importance than it appears to be for other metals. Bury et al. (1998) found that an increment on calcium concentration from 2 to 80 mg L^{-1} had a small influence on the 96-h LC_{50} for rainbow trout and *P. promelas*. These authors reported a 96-h Ag LC_{50} for juvenile *P. promelas* of 0.008 mg L^{-1} . Karen et al. (1999) reported that dissolved organic carbon was more important than hardness for predicting the toxicity of ionic silver in natural

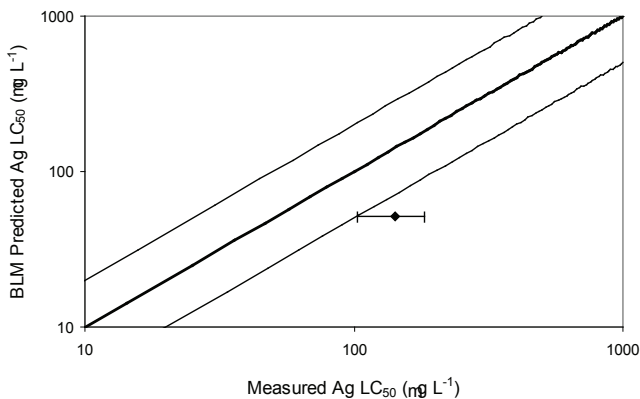


Figure 2. Calculated silver toxicity to *C. decemmaculatus* compared with predicted silver toxicity (LC_{50} , in $\mu\text{g Ag L}^{-1}$) using the Biotic Ligand Model developed for *P. promelas*. The thicker line represents a 1:1 relationship. The thinner lines represents predictions within a factor of 2. The error bars represent 95% confidence intervals.

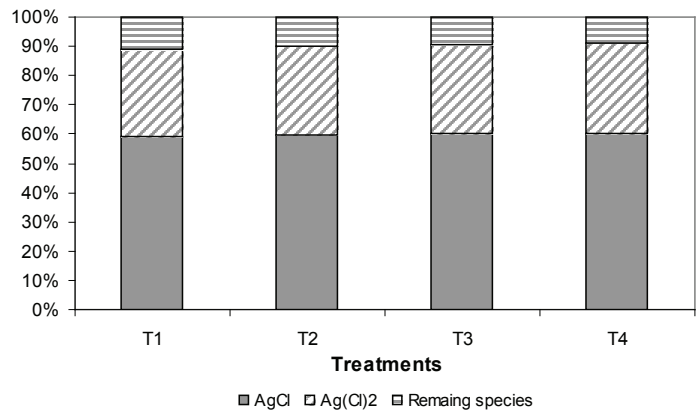


Figure 3. BLM speciation output for each treatment. Silver species are expressed as percentages of total dissolved silver concentration. Remaining species summarizes the contribution of the following species: free ion, AgCl_3 , AgCl_4 , AgNO_3 , AgSH , $\text{Ag}(\text{SH})_2$, Torg Ag, AgOH and $\text{Ag}(\text{OH})_2$.

waters to *O. mykiss*, *P. promelas*, and *D. magna*. On the other hand, Erickson et al. (1998) reported a substantial decrease in silver toxicity to *P. promelas* (96-h LC_{50} increase from 0.005 to 0.012 mg L⁻¹) when water hardness was increased from 48 to 249 mg L⁻¹ CaCO₃. Bielmyer et al. (2007) found that *C. dubia* and *P. promelas* were less sensitive to silver in waters with a combination of higher hardness and dissolved organic carbon. In water with a hardness of 225 mg L⁻¹ CaCO₃, these authors reported a 96-h LC_{50} for 7-days old *P. promelas* of 0.021 (0.019-0.023) mg L⁻¹. Despite the opposite results reported, higher 96-h LC_{50} estimated for *C. decemmaculatus* may reflect some protective effect exerted by Pilcomayo River water elevated hardness.

High levels of sodium are thought to inhibit silver accumulation through competition; however, Bury and Wood (1999) found that one-third of the silver uptake continued in presence of a sodium channel and ATPase blockers or high levels of sodium in water. Erickson et al. (1998) reported no significant effects on silver toxicity to *P. promelas* when 2 meq L⁻¹ of sodium sulphate were added to test water. This means that alternatively or additionally, multiple pathways exist for apical silver uptake at the gill cells. If multiple silver pathways are also present in *C. decemmaculatus*, the high levels of sodium in Pilcomayo River water did not exert a protective effect against silver toxicity.

Pilcomayo River dissolved organic matter levels are relatively low. Increased levels of organic carbon are expected to affect silver bioavailability through complexation. Bury et al. (1998) observed that an increase of 0.3 to 5.8 mg L⁻¹ in dissolved organic carbon reduced acute silver toxicity to rainbow trout and *P. promelas*. Erickson et al. (1998) reported that increased levels of dissolved organic carbon (from 1 to 11 mg C L⁻¹) significantly increased Ag LC_{50} for 30-day-old *P. promelas*. However, Rose-Janes and Playle (2000) highlighted the strong binding of Ag⁺ to trout gills and the relatively weaker binding of silver to dissolved organic matter. In the present contribution, dissolved organic carbon did not exert an important effect on silver speciation, since the predicted percentage of silver bound to dissolve organic matter was very low (0.52 %).

A net loss of chloride is also observed during silver exposure. The protective effect of high levels of chloride in water has been shown to be different among species. Some species

rely on branchial chloride uptake, which, in some species, is not inhibited by silver exposure, and others depend on multiple chloride uptake pathways. Apparently, chloride uptake pathways in *P. promelas* are not inhibited by silver exposure (Bielmyer et al. 2008). Given that chloride uptake pathways in *C. decemmaculatus* are unknown, we cannot suggest that high chloride concentration in Pilcomayo River water could have exerted a protective effect against silver toxicity. External chloride may also exert a protective effect through complexation. In this regard, BLM speciation output for each of the silver concentrations tested showed that 90% of the silver was as AgCl and AgCl₂. High chloride levels have been shown to protect *O. mykiss* against silver toxicity presumably by complexation to form AgCl, thereby reducing the concentration of Ag⁺. However, the formation of AgCl does not appear to substantially influence silver sensitivity for any other fish species tested (Bielmyer et al. 2008). Therefore, it remains to determine experimentally whether changes in silver speciation related to changes in chloride concentration reduce silver toxicity to *C. decemmaculatus*.

Water pH is another water quality parameter that would affect silver toxicity through speciation. During the present toxicity test, mean water pH was 8.3. In this regard, Erickson et al. (1998) reported a reduction in silver toxicity with increasing pH. The 96-h LC_{50} at pH 8.6 was three times higher than at pH 7.2. In the present toxicity test, higher 96-h LC_{50} for *C. decemmaculatus* may reflect some protective effect against silver toxicity exerted by the elevated mean water pH.

Silver BLM LC_{50} prediction for *P. promelas* in Pilcomayo River water did not agree well with the LC_{50} calculated for *C. decemmaculatus*. Bielmyer et al. (2007) in their silver BLM validation study found that only 50% of the LC_{50} predicted values for *P. promelas* were accurate within a factor of two. Higher 96-h LC_{50} for *C. decemmaculatus* may show that this species is less sensitive to silver toxicity than other fish species. However, it must be taken into account that almost all of the studies previously cited on silver toxicity to *P. promelas* worked with younger life-stages of the species which are known to be more sensitive to pollutants. In this regard, Bielmyer et al. (2007) reported higher 96-h LC_{50} for *P. promelas* as fish aged and Grosell and co-authors (2002)

reported higher sodium turnover in smaller animals compared with larger animals in fresh water. Bianchini et al. (2002) studied LC_{50} values based on total silver as a function of the body mass. According to their results, $\log LC_{50}$ progressively increased with \log body weight, independent of the species considered. For the mean body weight of the animals tested in the present contribution, the relationship found by these authors predicted a lower LC_{50} ($0.45 \mu\text{g Ag/L}$) compared to the value calculated for *C. decemmaculatus* ($140 \mu\text{g Ag/L}$). This difference may be another indicator of a lower sensitivity of *C. decemmaculatus* to silver toxicity.

In the present contribution, a clear pattern of mortality was observed. Most of the deaths occurred within the first five hours. Due to the fact that silver precipitation was observed, is possible that fish were in contact with higher silver concentrations during the first minutes to hours of the toxicity test. We did not measure silver accumulation on the gills but this pattern of mortality would correspond to a peak and decline in gill silver accumulation observed in static toxicity tests. Nebeker et al. (1983); Erickson et al. (1998) and Morgan et al. (2004) attributed this pattern of silver accumulation to changes in silver bioavailability through complexation with the increasing organic matter. In the present contribution, silver concentrations tested were higher compared to other toxicity tests performed, therefore, changes in silver bioavailability may have occurred mainly by silver precipitation.

CONCLUSIONS

C. decemmaculatus higher Ag 96-h LC_{50} may reflect that this species is less sensitive to silver than other fish species. The mortality pattern observed suggests that toxicity can be attributed to the initial dissolved silver concentrations. The ameliorative effect of water hardness on silver toxicity is not clear; however, Pilcomayo River water elevated hardness may have exerted some protective effect. Dissolved organic carbon contribution in reducing silver bioavailability was negligible. Elevated mean water pH may have exerted a major protective effect. More research is needed to determine the effects of high sodium and chloride concentrations on silver toxicity to *C. decemmaculatus*. The mortality pattern observed in this toxicity test may lend some support to a relationship between gill silver accumulation

and mortality. A cross-fish-species extrapolation of the *P. promelas* Ag BLM was not valid in Pilcomayo River water and experimental conditions of this toxicity test.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants of the University of Buenos Aires. The authors want to thank Subsecretaría de Recursos Hídricos-Argentina (SSRH) who kindly performed water sampling and monitoring operations at Misión La Paz. and provided Pilcomayo River water quality data. The authors also want to thank Mrs. Amalia González for the artwork and Dr. Sergio Gómez and Dr. Jimena González Naya for useful technical suggestions.

REFERENCES

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation (APHA, AWWA, WPCF). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington DC: APHA, AWWA, WPCF, 1992.
- Bianchini A., Grosell M., Gregory S.M., Wood C.M. Acute Silver Toxicity in Aquatic Animals Is a Function of Sodium Uptake Rate. Environ. Sci. Technol. 2002;36,1763-1766.
- Bielmyer G.K., Grosell M., Paquin P.R., Mathews R., Wu K.B. Validation study of the acute Biotic Ligand Model for silver. Environ Toxicol Chem. 2007;26(10):2241-2246.
- Bielmyer G.K., Brix K.V., Grosell M. Is Cl⁻ protection against silver toxicity due to chemical speciation? Aquat Toxicol. 2008;87:81-87.
- Bury N.R., Galvez F., Wood C.M. Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: comparison between rainbow trout and fathead minnows. Environ Toxicol Chem. 1999;18:56-62.
- Bury N.R. and Wood C.M. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. Am. J. Physiol. 1999;277:R1385-R1391.
- Casares M.V., de Cabo L.I.; Seoane R., Natale O., Castro Rios M., Weigandt C., F. de Iorio A. Measured copper toxicity to *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae) and predicted by Biotic Ligand Model in Pilcomayo River water: a step for a cross-fish-species extrapolation [on line]. J Toxicol [Accessed Nov

2012]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317198/pdf/JT2012-849315.pdf>

Clifford M. and McGeer J.C. Development of a biotic ligand model for the acute toxicity of zinc to *Daphnia pulex* in soft waters. *Aquat Toxicol.* 2009;91:26–32.

de la Torre F.R., Demichelis S.O., Ferrari L., Salibián A. Toxicity of Reconquista river water: bioassays with juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1997;58:558–565.

de la Torre F.R., Ferrari L., Salibián A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2002;131:271–280.

de la Torre F.R., Ferrari L., Salibián A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*): application to the toxicity assessment of the water of a periurban polluted river of Argentina. *Chemosphere.* 2005; 59:577–583.

Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R., Santore R.C. A biotic ligand model of the acute toxicity of metals I. Technical basis. *Environ Toxicol Chem.* 2001; 20: 2383–2396.

Erickson R.J., Benoit D.A., Mattson V.R., Nelson H., Leonard E.N. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ Toxicol Chem.* 1996;15:181–193.

Erickson R.J., Brooke L.T., Kahl M.D., Venter F.V., Harting S.L., Markee T.P., Spehar R.L. Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem.* 1998;17:572–578.

Ferrari L., García M.E., de la Torre F.R., Demichelis S.O. Evaluación Ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Rev. Museo Argentino de Ciencias Naturales. Vol. Extra Nueva Serie.* 1998;148:1–16.

Finney D.J. Statistical method in biological assay. London: Charles Griffin, 1978.

Gaillardet J., Dupré B., Louvat P., Allègre C. J. Global silicate weathering and CO₂ consumption rates deduced from the chemistry of large rivers. *Chemical Geology.* 1999;159:3-30.

Gómez S., Villar C., Bonetto C. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. *Environ Pollut.* 1998;99:159-165.

Grosell M., Nielsen C., Bianchini A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2002;133:287–303.

Karen D.J., Ownby D.R., Forsythe B.L., Bills T.P., La Point T.W., Cobb G.B., Klaine S.J. Influence of water quality on silver toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fathead minnows (*Pimephales promelas*), and water fleas (*Daphnia magna*) *Environ Toxicol Chem.* 1999;18(1):63-70.

Kennedy C.J. The toxicology of metals in fishes. In: *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment.* Farrell A. P. (ed). San Diego: Academic Press 3 2011: p. 2061- 2068.

Lauren D.J., McDonald D.G. Influence of water hardness, pH, and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Fish Aquat Sci.* 1986;43:1488–1496.

Matsuo A.Y.O., Playle R.C., Val A.L., Wood C.M. Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and soft water. *Aquat Toxicol.* 2004; 70: 63–81.

Menni R.C. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales No 5 2004 p.50- 53.

Morgan T.P., Grosell M., Gilmour K.M., Playle R., Wood C.M. Time course analysis of the mechanism by which silver inhibits active Na⁺ and Cl⁻ uptake in gills of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Comp Physiol.* 2004;287:R234-R242.

Nebeker A.V., McAuliffe C.K., Mshar R., Stevens D.G. Toxicity of silver to steelhead and rainbow trout, fathead minnows and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 1983;2:95-104.

Paquin P.R., Gorsuch J.W., Apte S., Batley G.E., Bowles K.C., Campbell P.G.C., Delos C.G., Di Toro D.M., Dwyer R.L., Galvez F., Gensmer R.W., Goss G.G., Hogstrand C., Janssen C.R., McGeer J.C., Naddy R.B., Playle R.C., Santore R.C., Schneider U., Stubblefield W.A., Wood C.M., Wu K.B. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2002;133:3-35.

Ratte H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Annual Review. Environ Toxicol Chem.* 1999;18(1):89-108.

Rose-Janes N.G. and Playle R.C. Protection by two complexing agents, thiosulphate and dissolved organic matter, against the physiological effects of silver nitrate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in ion-poor water. *Aquat Toxicol.* 2000;51:1-18.

Santore R.C., Mathew R., Paquin P.R., Di-Toro D. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2002;133:271-285.

Schlekat E.C., Van Genderen E., De Schamphelaere K.A.C., Antunes P.M.C., Rogevich E.C., Stubblefield W.A. Cross-species extrapolation of chronic nickel Biotic Ligand Model. *Sci Total Environ.* 2010;408:6148-6157.

Smolders A.J.P., Lock R.A.C., Van der Velde G., Medina Hoyos R.I., Roelofs J.G. Effects of Mining Activities on Heavy Metal Concentrations in Water, Sediment, and Macroinvertebrates in Different Reaches of the Pilcomayo River, South America. *Arch. Environ Contam Toxicol.* 2003;44:314-323.

Wood C.M. The biotic ligand model: Using physiology, geochemistry, and modeling to predict metal toxicity. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2008;148:(4)468-469.

Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad *in vitro* Gold nanoparticles: Applications and *in vitro* cytotoxicity

Mateo, Diego; Morales, Paloma; Ávalos, Alicia; Haza, Ana I.*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (España). Tel.: +34-91-394 3747; Fax: +34-91-394 3743.

*hanais@vet.ucm.es

Recibido: 25 de julio de 2013

Aceptado: 8 de septiembre de 2013

Resumen. En los últimos años, la evolución en el desarrollo de productos elaborados a partir de nanotecnología ha experimentado un espectacular crecimiento. En particular, las nanopartículas de oro han despertado gran interés en los sectores biomédico y alimentario, donde se ha descrito su utilización en el tratamiento frente al cáncer o como parte integrante de envases resistentes a la abrasión, con propiedades antimicrobianas. Por tanto, se cree que la exposición humana a las nanopartículas de oro aumentará considerablemente en los próximos años, pudiendo tener esto repercusiones sobre la salud. En este marco, el estudio de la toxicología de las nanopartículas ha revelado que su toxicidad depende de multitud de factores. Además, en la bibliografía hay cierta controversia en torno a los posibles efectos citotóxicos inducidos por las nanopartículas de oro. Diversos estudios de exposición *in vitro* han destacado su inocuidad en algunas líneas celulares, mientras que otros trabajos demostraron respuesta citotóxica. La siguiente revisión tiene por objeto describir las propiedades más relevantes de las nanopartículas de oro considerando sus potenciales aplicaciones en medicina y en la industria de los alimentos, así como examinar su posible toxicidad, con especial énfasis en los estudios de citotoxicidad *in vitro* disponibles hasta el momento.

Palabras clave: Oro; Nanopartículas; Citotoxicidad; Cáncer

Abstract. In the recent years, the development of nanotechnology-based products has experienced a spectacular growth. Especially, gold nanoparticles have awoken a great interest in the biomedical and food sector, where their applications in cancer treatment as well as their incorporation in abrasion resistant and antimicrobial packaging have been described. Therefore, it is believed that human exposure to gold nanoparticles will increase considerably in the next few years, which may arise possible human health hazards. Hence, toxicology studies on nanoparticles revealed that their toxicity depends on various factors. Furthermore, there is some controversy regarding to gold nanoparticle-induced cytotoxicity. Several *in vitro* studies have reported that gold nanoparticles are innocuous, while some investigations have demonstrated a cytotoxic response after the exposure to these. The aim of this review is to describe the most relevant properties of gold nanoparticles according to their possible applications in medicine and in food industry, as well as to provide information about their possible toxic effects, taking into account the cytotoxic *in vitro* studies published at present.

Keywords: Gold; Nanoparticles; Cytotoxicity; Cancer.

Nanotecnología es un término que engloba el conjunto de ciencias y técnicas que se aplican a escala atómica, molecular y macromolecular. En una recomendación de la Comisión Europea (Recomendación de la Comisión, de 18 de octubre de 2011) se define el término "nanomaterial" como "un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 5% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm".

Para poner en contexto esta escala de medida, un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro, una longitud 80.000 veces más pequeña que el diámetro de un cabello humano y 10 veces el diámetro de un átomo de hidrógeno.

En virtud de su pequeño tamaño, las propiedades exhibidas por los nanomateriales son muy diferentes a la de esos mismos materiales en su escala convencional (Jos y col. 2009), lo que ha motivado que estos materiales despierten un gran interés en multitud de sectores. De hecho, la evolución en el desarrollo de

productos elaborados a partir de nanomateriales ha ido en ascenso en los últimos años. Se han descrito numerosas aplicaciones de nanopartículas metálicas en la elaboración de productos de consumo masivo como filtros UV en cremas solares o telas "anti-olor" para vestimenta, baterías de litio, paneles solares, así como también para uso en medicina, como terapias anti-tumorales (The Project on Emerging Nanotechnologies 2012).

Actualmente, el mercado global de los nanomateriales se estima en 11 millones de toneladas, con un valor de 20.000 millones de euros. Se prevé que en el año 2015 los productos a base de nanotecnología tengan un volumen global de 2 trillones de euros (Comisión Europea (CE) 2011), lo que demuestra que se trata de un sector en pleno desarrollo.

Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico (Auffan y col. 2009). Además, las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.) (Al-Qadi y Remuñán-López 2009). Todo esto hace que las AuNPs despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario.

Aplicaciones de las nanopartículas de oro en medicina

Aunque pueda parecerlo, la utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en el año 2500 antes de Cristo. El descubrimiento por Robert Koch del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 (Higby 1982).

Hoy en día, las nanopartículas de oro destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas. En presencia de luz láser las AuNPs se activan y desprenden calor, siendo muy útiles en el tratamiento selectivo de células tumorales (Jain y col. 2008). Por ello, en los últimos años se han realizado notables esfuer-

zos en la investigación y en la aplicación de las AuNPs para la detección precoz, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Además de su extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos, las AuNPs pueden utilizarse en la elaboración de partículas nanoestructuradas para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas, así como en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA, etc.) (Chen y col. 2008). También destaca el empleo de las AuNPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya sea por activación de un estímulo biológico interno o externo (Han y col. 2006; Hong y col. 2006).

Aplicaciones de las nanopartículas de oro en la producción de alimentos

Otro importante campo de aplicación de las AuNPs es la industria de los alimentos, donde se las utiliza como parte integrante de nanocompuestos poliméricos. Éstos (que además de AuNPs pueden incluir otras nanopartículas de plata, de óxido de zinc o de óxido de aluminio) se utilizan en la fabricación de envases con propiedades antimicrobianas o para incrementar la resistencia a la abrasión de los envases (Chaudhry y col. 2008). Asimismo, ya se han elaborado indicadores de tiempo-temperatura a partir de AuNPs (Robinson y Morrison 2010). La empresa Timestrip UK Ltd. ha desarrollado un dispositivo a partir de oro coloidal, que permite establecer si los alimentos procesados y congelados, han sido mantenidos a temperatura adecuada a lo largo de la cadena de producción y distribución. El funcionamiento de este dispositivo adherido al envase, se basa en un fenómeno simple, ya que a temperaturas inferiores a la de congelación, se produce una aglomeración irreversible de las AuNPs dando lugar a una solución transparente. Por otra parte, cuando la temperatura sobrepasa el valor establecido, las AuNPs coloidal se dispersan en la suspensión, dando como resultado un color rojo intenso.

Una de las aplicaciones más interesantes de las AuNPs en el sector alimentario es el desarrollo de etiquetas de identificación por radiofrecuencia (RFID). Estos dispositivos permiten monitorizar determinados ítems a lo largo de toda la cadena de suministro, aumentando la eficacia y la rapidez de la distribución de

los productos. Para la impresión de estas etiquetas se utilizan materiales con propiedades electrónicas muy particulares, como AuNPs, de plata y de cobre (Subramanian y col. 2005).

Aspectos legales

A pesar de sus múltiples aplicaciones, actualmente en Europa no existe legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales, aunque éstos entran dentro de la definición de “sustancia” incluida en la Regulación Europea de Sustancias Químicas (REACH) (Reglamento n° 1907/2006 del Parlamento, de 18 de diciembre de 2006).

En mayo de 2011, y en respuesta a una petición de la Comisión Europea, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó la primera guía práctica para la evaluación del riesgo de la nanotecnología en alimentos y piensos. Esta guía contiene los procedimientos estandarizados necesarios para la caracterización física, química y toxicológica de los nanomateriales sujetos a evaluación en vista a su posible autorización, para su uso en alimentos y piensos. En 2012, la EFSA publicó el informe anual de la red de trabajo sobre la evaluación de riesgos de la nanotecnología en alimentos y piensos, con el fin de profundizar en la armonización de la evaluación del riesgo asociado a la nanotecnología en la Unión Europea (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) 2012).

No obstante, el proceso de normalización de esta tecnología se encuentra aún en una fase de recopilación de datos y todavía no es posible una evaluación general de riesgo para el uso de las nanotecnologías en el ámbito de la salud pública y la industria. Los resultados del proceso de evaluación determinarán las medidas de gestión necesarias que deberán implementar los organismos competentes (Frejo y col. 2011).

Toxicidad de nanopartículas

En virtud de sus numerosas aplicaciones, debemos asumir que la exposición humana a las AuNPs aumentará de forma sustancial en los próximos años, pudiendo tener repercusiones para la salud y el medio ambiente (Nowack y Bucheli 2007). Por ello, se impone la necesidad de evaluar los riesgos potenciales de las AuNPs y del resto de nuevos nanomateriales a fin de comprobar su potencial de riesgo (Maynard y col. 2006). En este contexto nace la “Nanotoxicología”, un campo de investiga-

ción emergente en el que, hasta el momento, son pocos los estudios publicados (Singh y col. 2009).

Los principales factores que determinan los efectos tóxicos de los nanomateriales en el organismo se pueden dividir en: factores que dependen de la exposición (vía de entrada, concentración y duración de la exposición), factores que dependen del organismo expuesto (susceptibilidad individual) y factores relacionados con la toxicidad intrínseca de la sustancia (factores físicos y químicos) (Rosell y Pujol 2010).

Existen tres vías principales a través de las cuales las personas pueden estar expuestas a los nanomateriales: inhalatoria, dérmica y oral. La vía de entrada más común de las nanopartículas al organismo es la inhalatoria (Uboldi y col. 2009). Las partículas ingresan al organismo por esta vía y, dependiendo de su tamaño, pueden ser exhaladas o bien depositarse en los diferentes compartimentos del aparato respiratorio (Nel 2005). Una vez depositadas en los pulmones, las nanopartículas pueden alcanzar el torrente circulatorio y distribuirse por otros órganos diana (Stone y col. 2007).

Las nanopartículas también pueden ingresar al organismo por vía dérmica, particularmente en el ambiente laboral, al depositarse sobre la piel, aunque esta vía de ingreso también puede ser utilizada por las nanopartículas presentes en cosméticos y cremas solares que las contienen (Tinkle y col. 2003). Desde la dermis es posible que las partículas alcancen la circulación linfática y sanguínea. La ingestión es una de las rutas más probables por la que las nanopartículas pueden ingresar al organismo (Böckman y col. 2000). Esto puede ocurrir de modo accidental, por la manipulación de nanomateriales, pudiendo pasar de las manos a la boca por una falta de higiene o también por la ingestión de alimentos que las contengan (Handy y Shaw 2007).

Una propiedad específica de las nanopartículas es su capacidad para atravesar las barreras biológicas mediante un proceso denominado “translocación” (Gálvez y Tanarro 2010). Este término se refiere a un proceso mediante el cual las nanopartículas atraviesan las barreras biológicas y pueden encontrarse en otras partes del organismo, distintas a las del punto de ingreso, pero manteniendo su integridad como partícula (es decir, sin que se produzca disolución).

Las partículas que ingresan a través del tejido

pulmonar son transportadas por la sangre y la linfa y pueden alcanzar diferentes órganos. Así, aunque el principal órgano diana es el hígado (Sonavane y col. 2008), algunos estudios han demostrado la localización de nanopartículas en el corazón y los riñones (Oberdörster y col. 2005).

La toxicidad intrínseca de los nanomateriales (Figura 1) (Rivera-Gil y col. 2013) no depende solamente de la composición química de la sustancia, sino también del tamaño de partícula, ya que en general, el tamaño de partícula es inversamente proporcional a su actividad biológica (Paul y Lyons 2008).



Figura 1. Factores relacionados con la toxicidad intrínseca de los nanomateriales (Gálvez y Tanarro 2010).

Con la miniaturización de las partículas de una sustancia aumenta la superficie específica, y por tanto su potencial reactivo o catalítico que en algunos casos puede conducir a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Maurer-Jones y col. 2010). De aquí se desprende que cuanto más pequeña es una par-

tícula mayor es su reactividad, de modo que una sustancia que es inerte en la escala micro o macro puede resultar tóxica en la escala nano. Por otra parte, las nanopartículas pueden localizarse dentro de la célula, en orgánulos donde las partículas macroscópicas no llegan, mostrando respuestas celulares espe-

cíficas (Porter y col. 2009).

Además de la variable tamaño, se ha comprobado que la toxicidad también depende de la morfología de la partícula. La toxicidad de nanopartículas con forma tubular es mayor que las que presentan forma irregular, y es menor para nanopartículas esféricas (Albanese y col. 2010).

Las nanopartículas tienen, por lo general, tendencia a formar aglomerados o agregados (Oberdörster y col. 2005). Este fenómeno puede influir en el lugar de depósito de las nanopartículas en el organismo, dependiendo de su grado de agregación. El fenómeno de agregación también modifica la toxicidad, ya que una estructura relativamente compacta presenta una superficie específica menor que una estructura porosa o alineada.

Citotoxicidad de las nanopartículas de oro

Actualmente existe cierta controversia en torno a los posibles efectos citotóxicos inducidos por las AuNPs. Así, diversos estudios *in vitro* han destacado la inocuidad de las AuNPs para células humanas cérvico-uterinas cancerosas (HeLa) y en células dendríticas (Connor y col. 2005; Villiers y col. 2010). Por el contrario, se han comprobado respuestas citotóxicas en líneas celulares alveolares humanas (Uboldi y col. 2009), en macrófagos (Lanone y col. 2009) y en fibroblastos de piel (Pernodet y col. 2006) tras su exposición a las AuNPs.

El efecto citotóxico de las AuNPs parece depender de multitud de parámetros y, por ejemplo, en la bibliografía se encuentran trabajos donde se sugiere que el tamaño de las AuNPs afecta su toxicidad, distribución tisular, capacidad de penetración y su absorción celular (Johnston y col. 2010). Pan y col. (2007) evaluaron la citotoxicidad *in vitro* de AuNPs de diferentes tamaños (1 y 15 nm) en HeLa, fagocitos (J774A1) y fibroblastos (L929) de ratón. Los resultados obtenidos mostraron que el tamaño de las AuNPs influye en su comportamiento, de modo que las más pequeñas presentaron una distribución generalizada en los tejidos y toxicidad más elevada (Pan y col. 2007). Kang y col. (2009) estudiaron la citotoxicidad de AuNPs de distintos tamaños (4, 15, 100 y 200 nm) en células de linfoma murino (L5178Y) y observaron que únicamente las AuNPs de 4 nm reducían significativamente la viabilidad celular.

Asimismo, los resultados de los escasos trabajos sobre toxicidad de las AuNPs *in vivo* publicados hasta el momento, demuestran que

la citotoxicidad está fuertemente determinada por el tamaño de partícula. También se ha investigado la permeabilidad de tejidos aislados de intestino de rata a las AuNPs de diferentes tamaños (15, 102 y 198 nm), observándose que la capacidad de penetración de las AuNPs depende del tamaño y del tiempo de contacto, de modo que las partículas más pequeñas penetran cuali-cuantitativamente de forma más eficiente al aumentar el tiempo del ensayo (Sonavane y col. 2008). De Jong y col. (2008) analizaron la distribución de las AuNPs de diferentes tamaños (10, 50, 100 y 250 nm) en ratas, 24 horas después de su administración intravenosa. Todas las AuNPs se acumularon principalmente en el hígado y en el bazo. No obstante, las AuNPs de menor tamaño (10 nm) se distribuyeron más ampliamente y alcanzaron un mayor número de órganos que las de mayor tamaño, demostrando que el tamaño de la AuNPs afecta su distribución.

Tal como fuera mencionado más arriba, la citotoxicidad de las AuNPs también depende de las líneas celulares expuestas. Choi y col. (2012) demostraron que tras 24 h de tratamiento, las AuNPs de 17 nm de diámetro provocaron diferentes efectos citotóxicos en células humanas de carcinoma pulmonar (A549 y NCI-H1975) y en células epidermoides (A431), obteniendo valores de $IC_{50} = 48,9; 52,3$ y $65,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En otro estudio llevado a cabo por Coulter y col. (2012) en células cancerosas de próstata y de mama tratadas con partículas de AuNPs de 1,9 nm se obtuvieron valores de $IC_{50} = 838$ y $1028 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el año 2005, Tsoli y colaboradores evaluaron la citotoxicidad de AuNPs, demostrando sensibilidad específica para cada una de las once líneas celulares empleadas (incluyendo células óseas, epiteliales y de hepatoma). Asimismo, Patra y col. (2007), observaron disminución en la viabilidad de las células A549 (carcinoma pulmonar) tras el tratamiento con AuNPs de 33 nm, mientras que las células HepG2 (hepatoma) no experimentaron un cambio significativo en su viabilidad bajo las mismas condiciones. Todos estos estudios corroboran el hecho de que la línea celular utilizada es un factor determinante en la evaluación de la citotoxicidad inducida por las AuNPs.

A pesar de que las posibles aplicaciones de las AuNPs resultan prometedoras, también resulta evidente que las AuNPs representan un riesgo potencial para la salud humana. Los estudios disponibles sobre la toxicidad de las

AuNPs son muy escasos y en ocasiones contradictorios. Por estos motivos resulta necesario el desarrollo de un mayor número de estudios sobre los efectos tóxicos de las AuNPs, con el fin de establecer condiciones seguras para su utilización en los diferentes campos de aplicación.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado gracias al proyecto de investigación AGL2010-16561 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Albanese A., Sykes E.A., Chan W.C. Rough around the edges: The inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. *ACS Nano*. 2010;4(5):2490-2493.

Al-Qadi S., Remuñán-López C. Nanopartículas metálicas: oro. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Nanotecnología farmacéutica. Madrid; 2009. pp. 223-248.

Auffan M., Rose J., Bottero J.Y., Lowry G.V., Jolivet J.P., Wiesner M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(10):634-641.

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria; EFSA Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed. [en línea]. Supporting Publications 2012 [consulta : 23 de mayo de 2013] EN-362. [9pp.]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/publications/>.

Böckman J., Lahl H., Eckert T., Unterhalt B. Titan-Blutspiegelvor und nach Belastungsversuchen mit Titandioxid. *Pharmazie*. 2000;55(1):140-143.

Chaudhry Q., Scotter M., Blackburn J., Ross B., Boxall A., Castle L., Aitken R., Watkins R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(3):241-258.

Chen P.C., Mwakwari S.C., Oyelere A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol Sci Applications*. 2008;1(1): 45-66.

Choi S.Y, Jeong S., Jang S.H., Park J., Park J.H., Ock K.S., Lee S.Y., Joo S. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2012;26(2):229-237.

Comisión Europea. Introduction to nanotechnologies. [en línea]. Bruselas; c1995-2013 [actualizado: 23 de abril de 2013; consulta: 23 de abril de 2013]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/nanotechnology/>.

Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005;1(3):325-327.

Coulter J.A., Jain S., Butterworth K.T., Taggart L.E., Dickson G.R., McMahon S.J., Hyland W.B., Muir M.F., Trainor C., Hounsell A.R., O'Sullivan J.M., Schettino G., Currell F.J., Hirst D.G., Prise K.M. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7(1):2673-2685.

De Jong W.H., Hagens W.I., Krystek P., Burger M.C., Sips A.J., Geertsma R.E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 2008;29(12):1912-1919.

Frejo M.T., Díaz M.J., Lobo M., Capó M. Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina balear*. 2011;26(2):36-46.

Gálvez V., Tanarro C. Toxicología de las nanopartículas. Seguridad y salud en el trabajo. 2010;(56):6-12.

Han G., Martin C.T., Rotello V.M. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des*. 2006;67(1):78-82.

Handy R.D., Shaw B.J. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society*. 2007;9(2):125-144.

Higby G.J. Gold in medicine: A review of its use in the west before 1900. *Gold Bull*. 1982;15(4):130-40.

Hong R., Han G., Fernandez J.M., Kim B.J., Forbes N.S., Rotello V.M. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.* 2006;128(4):1078-1079.

Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res.* 2008;41(12):1578-1586.

Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(4):328-346.

Jos A., Pichardo S., Puerto M., Sanchez E., Griolo A., Camean A.M. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line caco-2. *Toxicol In Vitro.* 2009;23(8):1491-1496.

Kang J.S., Yum Y.N., Kim J.H., Song H., Jeong J., Lim Y.T., Chung B.H., Park S.N. Induction of DNA damage in L5178Y cells treated with gold nanoparticle. *Biomolecules & Therapeutics.* 2009;17:92-97.

Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:14.

Maurer-Jones M.A., Bantz K.C., Love S.A., Marquis B.J., Haynes C.L. Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine.* 2009;4(2):219-241.

Maynard A.D., Aitken R.J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdorster G., Philbert M.A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S.S., Tran L., Walker N.J., Warheit D.B. Safehandling of nanotechnology. *Nature.* 2006;444(7117):267-269.

Nel A. Air pollution-related illness: Effects of particles. *Science.* 2005;308(5723):804-806.

Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.*

2006;311(5761):622-627.

Nowack B., Bucheli T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut.* 2007;150(1):5-22.

Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823-839.

Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahn-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007;3(11):1941-1949.

Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U., Lahiri P., Dasgupta A.K. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007;3(2):111-119.

Paul J., Lyons K. Nanotechnology: the next challenge for organics. *J. Org. Syst.* 2008;3(1):3-22.

Pernodet N., Fang X., Sun Y., Bakhtina A., Ramakrishnan A., Sokolov J., Ulman A., Raifailovich, M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small.* 2006;2(6):766-773.

Porter A.E., Gass M., Bendall J.S., Muller K., Goode A., Skepper J.N., Midgley P.A., Welland M. Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. *ACS Nano.* 2009;3(6):1485-1492.

Rivera-Gil P., Jimenez De Aberasturi D., Wulf V., Pelaz B., Del Pino P., Zhao Y., De La Fuente J.M., Ruiz De Larramendi I., Rojo T., Liang X.J., Parak W.J. The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):743-749.

Robinson D.K.R., Morrison M.J. Nanotechnologies for food packaging: Reporting the science and technology research trends: Report for the Observatory NANO; 2010 Aug.

Rosell M.G., Pujol L. Riesgos asociados a la nanotecnología. Madrid: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 2009. Notas Técnicas de Prevención, serie 23ª;797.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-191.

Sonavane G., Tomoda K., Sano A., Ohshima H., Terada H., Makino K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008;65(1):1-10.

Stone V., Johnston H., Clift M.J. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: Cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2007;6(4):331-340.

Subramanian V., Frechet J.M.J., Chang P.C., Huang D.C., Lee J.B., Molesa S.E., Murphy A.R., Redinger D. R. Progress toward development of all-printed RFID tags: Materials, processes, and devices. *Proc. of the IEEE.* 2005;93:1330-1338.

The Project on Emerging Nanotechnologies. Nanotechnology Consumer Products Inventory. [en línea]. Washington; 2005 [actualizado: 10 marzo de 2011; consulta: 20 mayo de 2013]. Disponible en <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>.

Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A., Roberts J.R., Salmen R., DePree K., Adkins E.J. Skin as a route of exposure and sensitization in

chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 2003;111(9):1202-1208.

Tsoli M., Kuhn H., Brandau W., Esche H., Schmid G. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small.* 2005;1(8-9):841-844.

Uboldi C., Bonacchi D., Lorenzi G., Hermanns M.I., Pohl C., Baldi G., Unger R.E., Kirkpatrick C.J. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:18.

Unión Europea. Recomendación de la Comisión, de 18 de octubre de 2011, relativa a la definición de nanomaterial. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 20 de octubre de 2011, núm. 275, pp. 38-40.

Unión Europea. Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 18 de diciembre de 2006, núm. 396, pp.1-852.

Villiers C., Freitas H., Couderc R., Villiers M.B., Marche P. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J Nanopart Res.* 2010;12(1):55-60.

Intoxicación con *Amanita phalloides*: serie de tres casos *Amanita phalloides* poisoning: series of three cases

Cortese, Silvia*; Risso, Marina; Trapassi, J. Horacio

TOXIMED Argentina. Paraguay 2342 1°A. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Tel: +5411 4964 0314.

*dra.s.cortese@gmail.com

Recibido: 5 de diciembre de 2011

Aceptado: 26 de agosto de 2012

Versión final recibida: 26 de septiembre de 2013

Resumen. Se presenta una serie de tres casos de pacientes adultos con intoxicación por *Amanita phalloides*, ocurridos entre los años 2010 y 2011. Dos pacientes eran de sexo masculino, de 40 y 75 años de edad, y la mujer de 65 años. En todos los casos se asoció el cuadro clínico a la práctica de recolección casera de hongos para preparación de alimentos (actividad sostenida durante más de 10 años en todos los casos). La recolección se realizó en zonas de robles en un caso, y en zonas de castaños en los otros dos casos. En los tres casos la consulta se realizó entre las 16 y 36 h de la ingesta. Los tres pacientes desarrollaron diarrea, hepatopatía y falla hepática sin encefalopatía. A todos se les realizó tratamiento con carbón activado seriado, aspirado duodenal y penicilina endovenosa. El trasplante hepático fue necesario en uno de los casos. No hubo secuelas hepáticas en ninguno de los pacientes. Conclusiones: la práctica de recolección de hongos silvestres para consumo humano es un hábito riesgoso si se realiza por personas inexpertas en el reconocimiento de las especies tóxicas. Si bien la intoxicación por *A. phalloides* es un cuadro poco frecuente, su alta morbimortalidad hace indispensable el reconocimiento temprano y abordaje oportuno por parte de los médicos.

Palabras clave: Hongos; *Amanita phalloides*; Recolección doméstica; Hepatotoxicidad.

Abstract. We present a series of three cases of *Amanita phalloides* poisoning in adult patients admitted during the period 2010 – 2011. Two patients were males of 40 and 75 years old, and the third was a woman of 65 years old. In all cases, the poisoning was associated with the home practice of collecting wild mushroom for cooking (activity traditionally carried out for more than 10 years in all cases). Mushroom collection was carried out in areas of oak trees for one case, and in areas of chestnuts trees in the two other cases. In all three cases the admission took place between 16 and 36 hours from intake. All three patients developed diarrhea, liver disease and liver failure without encephalopathy. All patients received treatment with activated charcoal (serial administration), duodenal aspiration and intravenous penicillin. Liver transplantation was necessary in one case. There were no hepatic sequelae in any patients. Conclusions: The practice of collecting wild mushrooms for human consumption is a risky habit if performed by people untrained in recognition of toxic species. While poisoning with *A. phalloides* is uncommon, its high mortality makes indispensable its early recognition and treatment by physicians.

Keywords: Mushrooms; *Amanita phalloides*; Home collection; Hepatotoxicity.

INTRODUCCIÓN

En la Argentina no existe una fuerte tradición cultural de consumo de hongos silvestres, debido a que no forman parte importante de la dieta de los argentinos. Sin embargo, existe un reducido número de personas que sí los consumen (Lechner y Albertó 2008). Es de destacar que la actividad de recolección de hongos silvestres para consumo humano no es llevada a cabo por personas idóneas en su reconocimiento, razón por la cual ocurren graves cuadros de intoxicación.

Amanita phalloides (Figura 1) es un hongo micorrizógeno (se alimenta de las raíces de los árboles bajo los cuales crece) (Wright 1975). Se introdujo a la Argentina en forma accidental con el cultivo de especies no nativas de roble, castaño y pino.

Pese a no ser una de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes, en los meses de febrero a mayo del año 2005, se registraron en el Centro Nacional de Intoxicaciones (Hospital A. Posadas) 35 casos de ingesta de hongos silvestres (0,27% del total de consultas en ese



Figura 1. *Amanita phalloides*.

período), 2 con evolución fatal por *Amanita phalloides* (Talamoni y col. 2006).

En la *Tabla 1* se presentan esquemáticamente los casos de tres pacientes con intoxicación por *A. phalloides*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

¿Es indispensable la identificación taxonómica si el ejemplar es *Amanita phalloides*?

La identificación del o de los hongos que pudo haber ingerido un paciente suele ser muy difícil, ya que:

- la mayoría de las veces no se cuenta con ningún ejemplar que pueda aportar el paciente o sus allegados;
- la toma de muestra del hongo (o su conservación) no se lleva a cabo correctamente y se pierden estructuras indispensables para su tipificación;
- no se dispone en forma inmediata del análisis de un Experto para determinar su género y especie;
- el ejemplar proporcionado para la identificación puede pertenecer a un género o especie diferente al ingerido por haber sido recolección mixta.

Por estas razones, la clasificación más útil de las intoxicaciones por hongos es la que se basa en características clínicas del cuadro de intoxicación, más que en la taxonomía del hongo. Así, en la mayoría de los casos puede realizarse un manejo terapéutico adecuado y estimación del pronóstico del paciente basándose en la anamnesis y en los síntomas del paciente (Lampe 1979; Hanrahan y col. 1984; Lampe 1987).

Se pueden mencionar diez grupos de toxinas fúngicas responsables de los distintos cuadros clínicos: ciclopéptidos, giromitrina, muscarina, coprina, ácido iboténico, muscimol, psilocibina, irritantes generales del tracto gastrointestinal, orellinina, norleucina alenica y miotoxinas (Flomenbaum y col. 2006).

Una clasificación general de las intoxicaciones por hongos en el ser humano, es según el momento de inicio de las manifestaciones clínicas. Así puede haber aparición temprana (aparición < 6 horas), tardía (aparición entre 6 y 24 horas) y síndromes retrasados (> 24 horas). De esta manera pueden agruparse (Díaz JH 2004):

- a. Clínica temprana: dentro de este grupo se observan síndromes: neurotóxicos, gastrointestinales y alérgicos.
- b. Clínica tardía: en este grupo se manifiestan la hepatotoxicidad (característica de *A. phalloides*), nefrotoxicidad y eritromelalgia.
- c. Síndromes retrasados: nefrotoxicidad retrasada, neurotoxicidad retrasada y rabdomiólisis.

La clasificación se muestra en la *Tabla 2*.

La mayoría de las intoxicaciones graves se relacionan con aquellas especies que elaboran ciclopéptidos, entre las que se encuentra *Amanita spp* y *Amanita phalloides*.

En el caso de los ciclopéptidos, es típico que causen cuadro clínico de comienzo tardío, con náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Esta característica ubica a *A. phalloides* dentro de los hongos con cuadro clínico de latencia prolongada (luego de las 6 horas de la ingesta), cuya gravedad es mucho mayor que aquellos de latencia corta (clínica precoz, antes de las 6 horas desde la ingesta). Esta diferenciación ya es suficiente para tratar como una intoxicación grave a todos aquellos pacientes que se presenten con un cuadro clínico compatible luego de las 6 horas de haber ingerido hongos.

Toxinas de *A. phalloides*

A. phalloides contiene de 15 a 20 ciclopéptidos; los mejor conocidos son las amatoxinas (octapéptidos cíclicos), las falotoxinas (heptapéptidos cíclicos) y las virotoxinas (también heptapéptidos cíclicos) (Kostansek y col. 1977; Wieland y col. 1978; Faulstich y col. 1979). Las amatoxinas son las más tóxicas, y dentro de éstas, la amanitina es la responsable de la toxicidad humana. Estas toxinas

Tabla 1. Resumen de los casos presentados.

	PACIENTE N° 1	PACIENTE N° 2	PACIENTE N° 3
Sexo	Masculino	Masculino	Femenino
Edad (años)	40	75	65
Práctica de recolección casera de los hongos	Sí	Sí	Sí
Árbol debajo del cual creció el hongo	Roble	Castaño	Castaño
Zona geográfica de recolección	Partido de 3 de Febrero, Provincia de Buenos Aires, Argentina	Partido de San Isidro, Provincia de Buenos Aires, Argentina	Punta del Este, Uruguay
Horas transcurridas entre la ingesta y el comienzo del cuadro gastrointestinal	8	10	12
Horas transcurridas entre inicio del cuadro y la consulta	16	20	36
Hepatopatía con transaminasas >4000 UI/L	Sí	Sí	Sí
Encefalopatía	No	No	No
Valor del Factor V de la coagulación ⁽¹⁾	42%	26%	<20%
Tratamiento con carbón activado seriado	Sí	Sí	Sí
Tratamiento con aspirado duodenal continuo	Sí	Sí	Sí
Tratamiento con penicilina G a 400.000UI/kg/día endovenosa	Sí	Sí	Sí
Trasplante hepático	No	No	Sí
Secuelas	No	No	No
Tipificación de los hongos (2)	Sí	Sí	No
Personas cercanas al paciente que hayan ingerido hongos	Sí ⁽³⁾	No	Sí ⁽⁴⁾

⁽¹⁾Valor normal del factor V: >60%. ⁽²⁾Tipificación de hongos llevada a cabo en Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires. ⁽³⁾La madre del paciente comió lo mismo que él y no desarrolló ninguna alteración clínica ni analítica. ⁽⁴⁾La empleada de la paciente compartió la comida con hongos y desarrolló mismo cuadro gastrointestinal e insuficiencia hepática aguda; fue atendida en Uruguay y recuperó funcionalidad hepática sin requerir trasplante.

Tabla 2. Clasificación de las intoxicaciones por hongos de acuerdo a las manifestaciones clínicas, al desarrollo de la intoxicación que producen y a la toxina responsable.

	Intoxicaciones con clínica temprana	Intoxicaciones con clínica tardía	Intoxicaciones con clínica retrasada
Cuadro clínico	Síndrome gastrointestinal: manifestación más frecuente	Hepatotoxicidad	Falla hepatorenal retrasada
Hongo	<i>Boletus spp.</i> <i>Chlorophyllum spp.</i> <i>Entoloma spp.</i> <i>Lactarius spp.</i> <i>Omphalotus spp.</i> <i>Tricholoma spp.</i>	<i>Amanita bisporigera</i> <i>A. hygroscofia</i> <i>A. ocreata</i> <i>A. phalloides</i> <i>A. suballiacea</i> <i>A. tenuifolia</i> <i>A. verna</i> <i>A. virosa</i> <i>Galerina spp.</i> <i>Lepiota spp.</i>	<i>Amanita spp.</i>
Toxina/mecanismo responsable	No están bien definidas las toxinas responsables.		
Cuadro clínico	Neurotoxicidad (NTX) colinérgica periférica	Falla renal acelerada	Falla renal retrasada.
Hongo	<i>Clitocybe spp.</i> <i>Inocybe spp.</i>	<i>Amanita proxima</i> <i>A. simithiana</i>	<i>Cortinarius spp</i>
Toxina/mecanismo responsable	Por alto contenido de muscarina	Se desconoce mecanismo exacto de toxicidad.	Contienen orellanina (nefrotóxica). Inhibe síntesis proteica y genera radicales libres. Genera nefritis túbulo intersticial.
Cuadro clínico	NTX Glutaminérgica	Eritromelalgia	NTX retrasada
Hongo	<i>Amanita muscaria</i> <i>Amanita pantherina</i>	<i>Clitocybe acromelalga</i> <i>C. amoenolens,</i> <i>Lepista inversa</i>	<i>Hapalopilus rutilans</i>
Toxina/mecanismo responsable	Por ácido iboténico y muscimol que alteran neurotransmisión GABA y glutamatérgica.	<i>Sería por ácidos acromélicos A y E, que activan receptores periféricos de dolor</i>	<i>Contienen ácido polipórico. Alteraciones motoras, visuales y de conciencia. Se desconoce mecanismo de acción exacto.</i>
Cuadro clínico	NTX epileptógena		Miotoxicidad y rabdomiólisis:
Hongo	<i>Gyromitra spp</i>		<i>Tricholoma spp.</i>
Toxina/mecanismo responsable	Inhibe producción de GABA.		Se desconoce mecanismo de acción.
Cuadro clínico	NTX alucinógena		
Hongo	<i>Psilocybe spp., Conocybe spp., Gymnopylus spp., Psathyrella spp.</i>		
Toxina/mecanismo responsable	Producen psilocybina, con actividad similar serotonina y similar LSD.		
Cuadro clínico	Síndrome alérgico neumónico		
Hongo	<i>Lycoperdon spp.</i>		
Toxina/mecanismo responsable	Por inhalación de sus esporas.		
Cuadro clínico	Reacción tipo Disulfiram		
Hongo	<i>Coprinus spp.</i>		
Toxina/mecanismo responsable	Toxina que inhibe la aldehído deshidrogenasa.		

son termoestables, insolubles en agua y pierden actividad luego de años de desecación. Todas estas características le confieren gran estabilidad y peligrosidad para el humano. 20 gramos de hongos contienen más de 0,1 mg/kg de amanitina (considerada dosis letal para el ser humano) (Pond y col. 1986; Paydas y col. 1990).

Fisiopatología

Las amatoxinas bloquean la síntesis proteica a través de la inhibición de la ARN polimerasa II, con especial tropismo por el hígado (también por riñón y cerebro) provocando muerte celular.

Recientemente se han realizado estudios *in vitro* mostrando la actividad de las amatoxinas en la generación de estrés oxidativo celular, reflejado por el aumento de la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), encargadas de la degradación de radicales libres (Magdalan y col. 2010).

Cuadro clínico

Se describe en tres etapas sucesivas (POISINDEX® Managements 2011), tal y como se presentaron los pacientes de los tres casos clínicos expuestos:

1. Primera fase: ocurre entre 6 y 24 horas posterior a la ingestión de *A. phalloides*. Se caracteriza por náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea, fiebre, taquicardia, hipoglucemia, hipotensión arterial, desequilibrios hidroelectrolíticos y del estado ácido base.
2. Segunda fase: 24 a 48 horas post ingesta. Hay mejoría del cuadro gastrointestinal inicial y comienzan a deteriorarse las funciones hepática y renal.
3. Tercera fase: 3 a 5 días post ingesta hay daño hepatocelular y falla renal. Si no hay recuperación de la funcionalidad hepática, la muerte suele presentarse entre 6 y 16 días post ingesta.

Tratamiento

Ante la posibilidad de una intoxicación con *A. phalloides*, debe iniciarse tratamiento en todo paciente con cuadro clínico compatible luego de la ingesta de hongos sin esperar la identificación de los mismos.

- a- Medidas generales. Manejo de vía aérea y ventilación, estabilización hemodinámica.
- b- Reposición hidroelectrolítica. Esta me-

didada es indispensable en la 2° fase (gastrointestinal) por la deshidratación que puede conllevar y debido a que una mala reanimación inicial podría empeorar el pronóstico, ya que el 90% de la amatoxina se elimina por orina dentro de las primeras 24 h.

c- Reducción de la reabsorción del tóxico. Debido a la clínica tardía, las medidas no tienen como finalidad la descontaminación gástrica. Dado que las amatoxinas tienen recirculación enterohepática (Jaeger y col. 1989), hay que intentar en toda medida eliminarlas. Una propuesta terapéutica es la siguiente:

- i. Colocación de sonda naso-duodenal (SND)
- ii. Carbón activado seriado (Kantola y col. 2009), a razón de 1 gramo/kg de peso la primera dosis, seguido de una dosis de catártico osmótico y luego 0,5 gramos/kg de peso cada 4 horas por SND.
- iii. Aspiración continua por SND, 2 horas después de aplicar cada dosis de carbón activado. El proceso se detalla

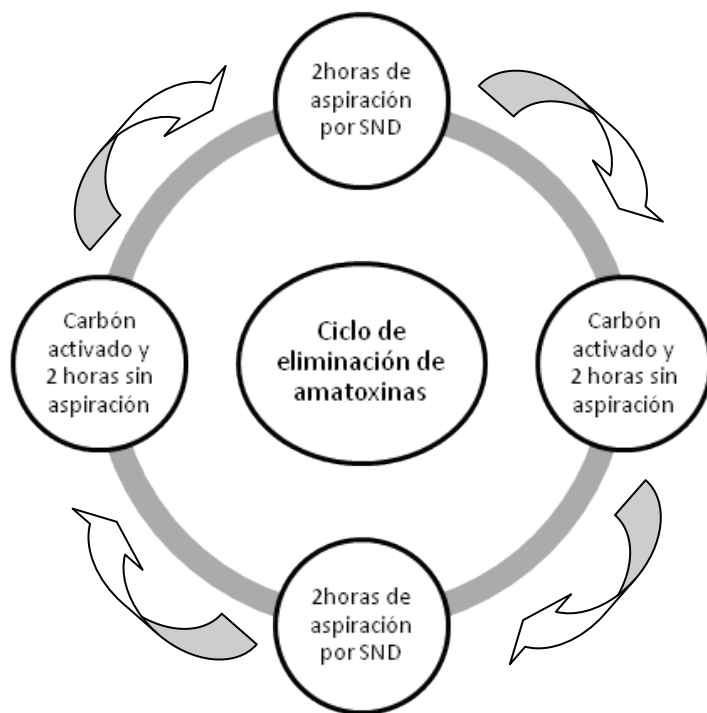


Figura 2. Ciclo de eliminación de las toxinas. SND: sonda naso-duodenal.

en la *Figura 2*.

d- Bloqueo de la captación de amatoxina por parte de los hepatocitos

iv. Penicilina G. Las dosis que han mostrado algún grado de eficacia rondan las 300.000 a 1 millón de UI/kg de peso/día endovenosas (máximo 24 millones UI/día) (Floersheim y col. 1978; Floeresheim y col. 1982; Floeresheim y col. 1987; Floeresheim y col. 1990; Kantola y col. 2009). Los datos existentes hasta el momento no muestran disminución de la mortalidad. Esta es la opción disponible actualmente en nuestro medio.

v. Silibinina: es el componente principal de la silimarina, obtenida de la planta *Silybum marianum* (conocido como "cardo mariano"). *In vitro* demostró bloquear el ingreso de amatoxina a los hepatocitos. Su dosis es de 20 a 50 mg/kg/día, administrados dentro de las 48hs de haberse producido la ingesta de hongos, durante 48 a 96 horas. Existe en formulaciones para administración oral y endovenosa (Jahn y col. 1980; Faulstich y col. 1980; Piering y col. 1990). No hay en Argentina.

e- Reducción del estrés oxidativo con N-acetilcisteína (NAC): la única evidencia consiste en estudios con ratones que mostraron que era inefectiva en dosis única (Schneider y col. 1989) y en una serie de casos (11 pacientes) en los que se realizó NAC con el mismo régimen que en intoxicación con paracetamol (Montanini y col. 1999). En este último trabajo, la NAC se inició durante la fase gastrointestinal y en conjunto con el resto de la terapéutica (descrita en párrafos previos). Diez pacientes sobrevivieron y uno (que presentaba hepatitis B concomitante) presentó falla hepática fulminante y muerte. Dada la inocuidad de la N-acetilcisteína, se propone administrarla como medida terapéutica en esta grave intoxicación. No hay régimen de administración establecido para estos casos.

f- Antídoto: no hay antídoto específico.

g- Aumento de la eliminación

i. Dado que las amatoxinas son aclaradas rápidamente del plasma por los riñones, las técnicas de remoción extracorpórea podrían no ser significativas en su eliminación (Faulstich y col. 1985; O'Brien y col. 1996). Los

estudios al respecto hablan de ventanas terapéuticas que rondan las 24 a 36 horas desde la ingesta, para hallar amatoxinas circulantes pasibles de ser hemodializadas.

ii. La hemoperfusión sería útil en las primeras 24 horas de la intoxicación o durante la falla hepática (Mullins y Horowitz 2000)

iii. Siempre que se trate de pacientes con falla renal (previa o desarrollada por el cuadro gastrointestinal inicial, o síndrome hepatorenal en estadios avanzados de la intoxicación) se realizarán técnicas de remoción extracorpórea pertinentes a cada caso, en manejo conjunto con Servicio de Nefrología.

h- Trasplante hepático

i. La toxicidad por hongos es una causa rara de falla hepática fulminante.

ii. Un estudio retrospectivo de 1967 a 2002 evaluó medidas de predicción de evolución a falla hepática fulminante luego de intoxicación con amatoxinas. Se observó que la combinación de tiempo de protrombina <26% con creatinina sérica > 106 mcmmol/L en los días 3 a 10 de la intoxicación, fue el mejor predictor de letalidad (Magdalan y col 2010).

iii. La alteración en las pruebas de coagulación y la progresión de la encefalopatía hepática son los parámetros más importantes para establecer la probable progresión a falla hepática fulminante y, en consecuencia, a la necesidad de trasplante hepático. Debido a su baja frecuencia de presentación no puede compararse este cuadro a otros generados por intoxicaciones más frecuentes (como paracetamol) y debería analizarse en cada paciente en particular (Feinfeld y col. 1994). Siempre que se esté tratando a un paciente con esta intoxicación, deben iniciarse en forma temprana gestiones con el Centro de Trasplante de Órganos más cercano al Centro Asistencial donde se desarrolle la atención.

DISCUSIÓN

La práctica de recolección de hongos silvestres para consumo humano es un hábito que se observa frecuentemente, y es muy riesgoso si se realiza por personas inexpertas en el

reconocimiento de las especies tóxicas. La intoxicación por *A. phalloides* es un cuadro poco frecuente, pero por su alta morbimortalidad es indispensable el reconocimiento temprano y abordaje oportuno por parte de los médicos. Hay que resaltar que aunque haya habido un foco epidemiológico de intoxicación por *A. phalloides* - como ocurrió en los casos clínicos N° 1 y 3 - no siempre se desarrollará el cuadro clínico en las demás personas; no obstante es imperiosa la identificación de todos los posibles afectados para realizar su evaluación clínica y analítica, y su tratamiento oportuno si fuera necesario.

Dado que actualmente sólo se cuenta con medidas inespecíficas para el tratamiento de esta intoxicación, es fundamental su instauración inmediata apenas se tenga sospecha del cuadro, de manera tal que se reduzca la probabilidad de evolución a fallo hepático fulminante y muerte.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Lechner B.E., Albertó E. Especies tóxicas de Agaricales halladas en la Argentina: nueva cita de *Amanita pantherina* y reevaluación de la comestibilidad de *Tricholoma equestre*. Bol. Soc. Argent. Bot. 2008;43(3-4):227-235.

Burton J.R.Jr., Ryan C., Shaw-Stiffel T.A. Liver transplantation in mushroom poisoning. J Clin Gastroenterol. 2002;35(3):276-80.

Diaz, J.H. Evolving global epidemiology, syndromic classification, general management, and prevention of unknown mushroom poisonings. Review Articles. Crit Care Med. 2005;33(2):419-26.

Faulstich H., Jahn W., Wieland T. Silybin inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver. Arzneimittelforschung. 1980a; 30:452-454.

Faulstich H., Talas A., Wellhoner H.H. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dogs. Arch Toxicol. 1985;56:190-194

Faulstich H. New aspects of *Amanita* poisoning. Klin Wochenschr. 1979;57:1143-1152

Feinfeld D.A., Mofenson H.C., Caraccio T. Poisoning by amatoxin-containing mushrooms in suburban - report of four cases. Clin Tox.

1994;32(6):715-721.

Floersheim G.L., Bieri A., Koenig R. Protection against *Amanita phalloides* by the iridoid glycoside mixture of *Picrorhizakurroa* (kutkin). Agents Actions. 1990;29:386-387.

Floersheim G.L., Eberhard M., Tschumi P. Effects of penicillin and silymarin on liver enzymes and blood clotting factors in dogs given a boiled preparation of *Amanita phalloides*. Toxicol Appl Pharmacol. 1978;46:455-462.

Floersheim G.L., Weber O., Tschumi P. Die klinische Knollenblatterpilzvergiftung (*Amanita phalloides*): prognostische faktoren und therapeutische massnahmen. Schweiz Med Wschr. 1982;112:1164-1177.

Floersheim G.L. Treatment of human amatoxin mushroom poisoning myths and advances in therapy. Med Toxicol. 1987;2:1-9.

Goldfrank L.R. Mushrooms. En: Flomenbaum N.E.; Goldfrank L.R.; Hoffman R.S., Howland M.A., Lewin N.A., Nelson, L.S., Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 8th Edition. Nueva York: McGraw-Hill; 2006. p. 1556-1576.

Hanrahan J.P, Gordon M.A. Mushroom poisoning: Case reports and a review of therapy. JAMA. 1984;251:1057-1061.

Jaeger A, Jehl F, Flesch F. Amatoxins kinetics in *Amanita phalloides* poisoning. Vet Hum Toxicol. 1989; 31:360

Jahn W., Faulstich H., Wieland T. Pharmacokinetics of (3H)-methyl-dihydroxymethyl-amanitin in the isolated perfused rat liver, and the influence of several drugs. En: Faulstich H., Kommerell B., Wieland T. (Eds): *Amanita* Toxins and Poisoning, Baden-Baden, Germany, Witzstrock Publishing; 1980. p. 80-85.

Kantola T, Kantola T, Koivusalo AM: Early molecular adsorbents recirculating system treatment of *Amanita mushroom* poisoning. Ther Apher Dial. 2009;13(5):399-403.

Kostansek E.C., Lipscomb W.N., Yocum R.R. Thiessen W.E. The crystal structure of the mushroom toxin beta-amanitin. J Am Chem Soc. 1977;99:1273-1274.

- Lampe K.F., McCann M.A: Differential diagnosis of poisoning by North American mushrooms with particular emphasis on *Amanita phalloides*-like intoxication. *Ann Emerg Med.* 1987;16:956-962.
- Lampe K.F. Toxic fungi. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 1979;19:85-104.
- Magdalan J., Piotrowska A., Gomułkiewicz A., Sozański T., Szeląg A., Dziegieł P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with alpha-amanitin. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(1):38-43.
- Montanini S., Sinardi D., Praticò C., Sinardi A.U., Trimarchi G. Use of acetylcysteine as the life-saving antidote in *Amanita phalloides* (death cap) poisoning. Case report on 11 patients. 1999;49(12):1044-7.
- Mullins M.E, Horowitz B.Z. The futility of hemoperfusion and hemodialysis in *Amanita phalloides* poisoning. *Vet Human Toxicol.* 2000;42:90-91.
- O'Brien B.L. Khuu L. A fatal Sunday brunch: *Amanita mushroom* poisoning in a gulf coast family. *Amer J Gastroenterol* 1996;91:581-583.
- Paydas S., Kocak R., Erturk F., Erken E., Zaksu H.S., Gurcay A. Poisoning due to amatoxin containing *Lepiota* species. *Br J Clin Pract.* 1990;44:450-453.
- Piering W.F., Bratanow N. Role of the clinical laboratory in guiding treatment of *Amanita virosa* mushroom poisoning: report of two cases. *Clin Chem.* 1990;36:571-574.
- Poisindex® managements. Mushrooms-cyclopeptides. *Micromedex®1.0 (Healthcare Series).* 2011.
- Pond S.M., Olson K.R., Woo O.F., Osterloh J.D., Ward R.E., Kaufman D.A., Moody R.R. Amatoxin poisoning in northern California, 1982-1983. *West J Med.* 1986;145:204-209.
- Schneider S.M., Vanscoy G.J., Michelson E.A: Combination therapy with cimetidine, penicillin, and ascorbic acid for alpha amanitin toxicity in mice. *Ann Emerg Med.* 1989;18:482.
- Talamoni M., Cabrerizo S., Cari C., Díaz M., Ortiz de Rozas M., Sager I. Intoxicación por *Amanita phalloides*, diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr.* 2006;104(4):372-374.
- Wieland T.H., Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita mushrooms*. *CRC Crit Rev Biochem.* 1978;5:185-260.
- Wright J. Hongos tóxicos en la Argentina. *Sociedad Argentina de Horticultura.* 1975;182:119-121.

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

El envío de manuscritos se realizará a través del Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) del Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT). En la página web del PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> se encuentran las instrucciones para los autores.

La recepción de manuscritos a través de la cuenta envios.acta.ata@gmail.com se mantendrá hasta el 30 de diciembre de 2013 y luego se reemplazará por el sistema en línea.

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

Aboud 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.htm>Article

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 theses. 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

Submission of manuscripts will be made

through the Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) of the Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT). Instructions for authors will be found at the Acta-PPCT-CAICYT web page <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata>

Manuscript reception at the email account `envios.acta.ata@gmail.com` will remain in effect until December 30th, 2013, then it will be replaced by the on line system.

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 [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 de 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 diante *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

O envio de manuscritos será realizado através do Portal de Publicações Científicas e Técnicas (PPCT) do Centro Argentino de Informação Científica e Tecnológica (CAICYT). Na página web do PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> estão apresentadas as instruções para autores.

A recepção de trabalhos através da conta envios.acta.ata@gmail.com será mantida até a data de 30 de dezembro de 2013. Após esta data a forma de envio será substituída pelo sistema online.

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 sobrenomes 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 patients. *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

Aboud 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.htm>Article.

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.