

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 22
N° 2
Septiembre 2014

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 Milano, Italia*

Estela Giménez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

José M. Monserrat, *Universidad de Rio 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

Análise preliminar da citotoxicidade dos aditivos alimentares urucum e cúrcuma <i>Chagas, Luma Cipriano; Meireles de Deus, Maria do Socorro; Peron, Ana Paula</i>	69
Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário <i>in vitro</i> do α -pineno e carvacrol <i>Sobral-Souza, Celestina E.; Leite, Nadghia F.; Brito, Dara I.V.; Lavor Anne K.L.S.; Alencar, Liscássia B.B.; Albuquerque, Rosimeire S.; Ferreira, João Victor A.1; Freitas, Maria A.; Matias, Edinardo F.F.; Andrade, Jacqueline C.; Tintino, Saulo R.; Morais-Braga, Maria F.B.; Vega, Celeste.; Coutinho, Henrique D.M.</i>	76
Optimización en la recuperación de inmunoglobulinas, como molécula entera y fragmento F(ab) ₂ , en la producción de antivenenos <i>Litwin, Silvana; Isabettini, Alberto Oscar; Calderón, Leandro; Varni, Liliana Mónica</i>	82
Reporte de casos	
Intoxicación severa por ácido valproico <i>Docampo, Patricia C.; Parodi, Claudia; Dominguez, Mónica; Rodríguez, Estela; Gallo, Ignacio; Laguado Nieto, Marlon A.</i>	90
Instrucciones para los autores	95

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

ARTÍCULOS

Análise preliminar da citotoxicidade dos aditivos alimentares urucum e cúrcuma Cytotoxicity of the food additive annatto and turmeric

Chagas, Luma Cipriano; Meireles de Deus, Maria do Socorro; Peron, Ana Paula*

Universidade Federal do Piauí. Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB) Departamento de Ciências da Natureza. Curso de Ciências Biológicas. Endereço: Rua Cícero Duarte, 940. Bairro Junco. Picos, Piauí, Brasil. CEP 64600-640. Fone (89) 3422-1024.

*anpapegenpes@hotmail.com

Recibido: 31 de octubre de 2013

Aceptado: 14 de marzo de 2014

Resumo. Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação dos aditivos alimentares urucum e cúrcuma em células meristemáticas de pontas de raízes de *Allium cepa* nas doses de 5 e 10 g, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas. Utilizou-se para cada dose um grupo de cinco bulbos de cebolas, que primeiramente foram enraizados em água destilada, e em seguida transferidos para as suas respectivas doses. Analisaram-se células em todo ciclo celular, totalizando 5.000 para cada controle e tempo de exposição. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística do Qui-quadrado ($p < 0,05$). A partir dos resultados observou-se que as doses do urucum e do cúrcuma tiveram efeito antiproliferativo significativo sobre o ciclo celular deste sistema-teste. Também foi verificado número significativo de aberrações celulares nos dois tempos de exposição avaliados de todas as doses estudadas. Portanto, nas condições analisadas, o urucum e o cúrcuma mostraram-se citotóxicos e genotóxicos.

Palavras-chave: *Bixa orellana* L.; *Curcuma longa* L.; Divisão celular; Aberrações celulares.

Abstract. This study aimed to evaluate the effect of food additives annatto and turmeric tip cells of *Allium cepa* roots in doses of 5 or 10 g in exposure times of 24 and 48 hours. A group of five onion bulbs was used for each dose. Each dose was first embedded in distilled water and then transferred to their respective doses. Cells were analyzed throughout the cell cycle, totaling 5000 for each control and exposure time. The obtained data were subjected to statistical analysis Chi-square ($p < .05$). From the results it was observed that the doses of turmeric and annatto had significant antiproliferative effect on the cell cycle of this test system. They also found a significant number of cellular aberrations in the two exposure times evaluated all doses studied. Therefore, under the conditions studied, annatto and turmeric proved cytotoxic and genotoxic.

Keywords: *Bixa orellana* L.; *Curcuma longa* L.; Cell division; Cellular aberrations.

INTRODUÇÃO

Atualmente, os hábitos alimentares associados ao estilo de vida expõem o homem a fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (Feng *et al.* 2009). Dentre estes fatores está à realização de dietas desequilibradas e amplamente constituídas por aditivos alimentares sintéticos, como temperos, conservantes, corantes, aromatizantes e emulsificantes (Cheeseman 2012). Estes aditivos, apesar de terem baixo custo de produção e proporcionarem maior tempo de validade aos alimentos, são polêmicos quanto a sua ação no organismo e apontados como responsáveis em causar várias reações adversas (Sayed *et*

al. 2012). Dessa forma, os aditivos alimentares vegetais, em função de sua origem natural e, dependendo da planta, por suas propriedades medicinais, são preferíveis e recomendados à população por profissionais da saúde para o preparo de alimentos e também na escolha de alimentos industrializados (Wolstad e Culver 2011). Dentre estes aditivos pode-se citar o urucum e o cúrcuma.

O urucuzeiro (*Bixa orellana* L., Família Bixaceae), também conhecido como urucum, é um arbusto nativo do Brasil, no entanto, é encontrado em toda a América Latina. Suas sementes moídas são valorizadas mundialmente como tempero e como corantes, em função de

haver em seu pericarpo os apocarotenóides bixina e nor-bixina, compostos estes que proporcionam a cor vermelha. Porém, muitos outros compostos químicos são encontrados nestas sementes, como açúcares, óleos essenciais, proteínas, outros carotenóides e vitaminas. Ainda e conforme relatado na literatura científica às sementes desta planta tem ações anti-febril, antidiarreica, antioxidante (Santos et al. 2012) e quimiopreventiva (Tsurama et al. 2012). Na América do Sul, a utilização mais conhecida do urucum é o produto obtido da mistura de suas sementes moídas com o fubá de milho, conhecido como colorau, que proporciona coloração amarelo-avermelhada a alimentos como arroz, bifes, frangos, farofas, molhos, queijos, massas, cereais e rações animais (Avancini et al. 2008).

Os rizomas da *Curcuma longa* (Família Zingiberaceae), planta popularmente conhecida como cúrcuma, são ricamente constituídos por amido, óleos essenciais e curcuminóides. As raízes desta planta, principalmente moídas, são utilizadas como temperos e na coloração de alguns alimentos como queijos processados, páprica, produtos à base de gordura e pasta de mostarda, dando-os coloração amarelada, característica esta proporcionada, principalmente, pelo curcuminóide curcumina (Pan et al. 2008).

Estes rizomas, de acordo com a literatura, mostraram ter propriedades medicinais como ações anti-inflamatórias, inibidora do crescimento de microrganismo em colicistite (Kim et al. 2012) e propriedade antioxidante (Pan et al. 2008). Também demonstrou, em testes de laboratório, ter potencial para desacelerar vias de peroxidação lipídicas (Reddy et al. 2005), ter ação preventiva na iniciação de alguns tipos de câncer (Mahfouz et al. 2011), inibir a proliferação de células neoplásicas em roedores (Bulku et al. 2012) e inibir a angiogênese induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos desacelerando a formação de metástases neoplásicas (Ejaz et al. 2009).

Assim, a presença marcante do urucum e da cúrcuma no preparo de alimentos e as suas propriedades farmacológicas fazem destes aditivos umas das substâncias mais consumidas no mundo (Pollar-Cabrera et al. 2010). Os valores da Ingestão Diária Aceitável (IDA), segundo Brasil (Resolução RDC 276 2005), para o urucum e o cúrcuma é de 2,5 mg/Kg/dia e 0,5 mg/Kg/dia, respectivamente, porém, segundo Bautista et al. (2004), plantas, bem como os seus produtos, na maioria das vezes, são inge-

ridas de forma indiscriminada pela população que as rotula como naturais e, erroneamente, como inócuas. Dessa forma, torna-se relevante avaliar os potenciais efeitos tóxicos, em nível celular, destes dois aditivos alimentares.

Os bioensaios com plantas são considerados adequados e rápidos para o monitoramento de efeitos tóxicos de compostos químicos (USE-PA) (Grant 1999; Herrero et al. 2012) e a *Allium cepa* (cebola) é um eficiente organismo bioindicador de citotoxicidade de extratos oriundos de plantas (Fachinetto et al. 2007; Sabini et al. 2011) por suas propriedades cinéticas de proliferação e por possuir cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16), o que facilita a sua análise (Caritá e Marin-Morales 2008; Herrero et al. 2012). Este sistema teste também é eficiente na avaliação de genotoxicidade visto que por meio dele é possível observar anomalias do ciclo mitótico, como metáfase colchícinica, pontes anáfasicas e telofásicas; e anomalias interfásicas, como micronúcleos e células binucleadas (Matsumoto et al. 2006; Leme e Marin-Morales 2008).

Portanto, devido à ampla utilização do cúrcuma e do urucum em alimentos e considerando a *A. cepa* como um bioensaio adequado para avaliação de compostos químicos em nível celular, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação destes dois aditivos alimentares vegetais, na forma *in natura*, sobre o ciclo celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

Materiais e método

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Município de Picos, Estado do Piauí, no período de outubro de 2011 a junho de 2012.

Obtenção dos aditivos alimentares e de suas doses

As sementes de *B. orellana* e as raízes de *C. longa* foram obtidas em um horto medicinal localizado na cidade de Teresina, Estado do Piauí, no mês de setembro de 2012. As doses de 5 g e 10 g foram obtidas triturando cinquenta sementes de urucum em 20 ml de água destilada em liquidificador, por cinco minutos, o que produziu uma solução bastante vermelha e oleosa.

Para obtenção das doses de cúrcuma, de 5 e 10 g, três raízes, com 200 g cada, foram cortadas em pequenos pedaços que foram colo-

cados para desidratar por 24h, a sombra e a temperatura ambiente. Em seguida, os pedaços, juntamente com 20 ml de água destilada, foram triturados em liquidificador, por cinco minutos, o que produziu uma solução amarela e oleosa. A água destilada adicionada foi com o intuito de apenas facilitar a trituração destes dois aditivos em liquidificador.

As doses de 5 e 10 g estabelecidas neste estudo são consideradas altas para o sistema teste em questão. Optou-se por elas em função de que plantas, partes de plantas ou os seus produtos, na maioria das vezes e conforme citado por Bautista et al. (2010), são utilizados indiscriminadamente pela população. Dessa forma, achou-se pertinente avaliar a toxicidade em nível celular de dosagens mais elevadas do urucum e do cúrcuma.

É importante esclarecer que para esta avaliação de toxicidade utilizou-se o macerado bruto tanto do urucum como do cúrcuma, ou seja, não foi realizado o isolamento de nenhum dos seus compostos químicos. Assim, as raízes das cebolas foram colocadas diretamente em contato com as soluções obtidas, onde se teve o cuidado de verificar se as raízes de cada bulbo estavam em contato adequado com as doses estudadas.

Também é pertinente esclarecer que junto ao macerado de urucum e cúrcuma moídos encontrados a venda no comércio ocorre a adição de ingredientes, como por exemplo, de fécula, amido e substâncias antioxidantes artificiais, que, aparentemente, diminuem o teor de oleosidade destes aditivos. Neste trabalho não foi adicionado nenhum ingrediente aos extratos obtidos dos dois aditivos em questão.

Obtenção de células meristemática para a análise citogenética

As cebolas (*A. cepa*), em média com 300g cada, foram colocadas para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e aerada, até a obtenção de raízes com cerca de 2,5 cm de comprimento. Para análise de cada dose estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola.

Antes de se colocar as raízes em contato com as suas respectivas doses, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle (CO) do próprio bulbo. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), a temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas doses, por 24 horas, pro-

cedimento este denominado de tempo de exposição 24 horas (TE 24h).

Após este tempo foram retiradas algumas raízes e fixadas. Feito este procedimento, as raízes restantes de cada bulbo foram devolvidas as suas respectivas doses onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição 48 horas (TE 48h). Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. Os tempos de exposição de 24 e 48h foram escolhidos com o intuito de se avaliar a ação dos extratos em mais de um ciclo celular, visto que, cada ciclo de divisão celular em células meristemática de raízes de *A. cepa* é de, em média, 20h. Para cada coleta de raiz, retirou-se, em média, três raízes por bulbo de cebola.

Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados

As lâminas, em média três por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002). Cada lâmina foi corada com duas gotas deorceína acética a 2% (Fachinetti e Tedesco 2009) e analisada em microscópio óptico, em objetiva de 40X. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle e tempo de exposição. Observaram-se células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Foi calculado o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição e determinado o índice mitótico.

Avaliou-se também o potencial genotóxico das concentrações por meio do número de células micronucleadas, de metáfases colchícinicas, pontes anáfasicas e telofásicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), com nível de probabilidade <0.05 , por meio do software estatístico BioEstat 3.0 (Ayres 2007).

Resultados

Na *Tabela 1*, é apresentado o número de células em interfase, o número de células em divisão e os valores de índice mitóticos obtidos de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas com água destilada e com duas doses de urucum e de cúrcuma, nos TE 24 e 48h.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que as duas doses testadas de cúrcuma e urucum inibiram significativamente o índice mitótico (IM) das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* nos dois TE quando confrontado com o IM dos seus respectivos controles. Quando

Tabela 1. Número de células em intérfase, número de células em divisão e os valores de índice mitóticos obtidos de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas com água, e com cúrcuma e urucum nas doses de 5 e 10 g, nos TE 24 e 48h.

Aditivo/Dose (g)	TE	Células em Intérfase	Células em Divisão	IM (%)
Urucum 10,0	CO	3.180	1.820	36,4 ^a
	24h	3.800	1.200	24,0 ^b
	48h	3.915	1.085	21,7 ^b
Urucum 5,0	CO	3.360	1.640	32,8 ^a
	24h	3.854	1.146	22,9 ^b
	48h	3.929	1.071	21,4 ^b
Cúrcuma 10,0	CO	2.810	2.190	43,9 ^a
	24h	3.365	1.635	32,7 ^b
	48h	3.477	1.523	30,4 ^b
Cúrcuma 5,0	CO	3.048	1.952	39,0 ^a
	24h	3.650	1.350	27,0 ^b
	48h	4.000	1.000	20,0 ^b

CO – Controle; TE – Tempo de exposição, IM – Índice Mitótico. Médias seguidas da mesma letra entre os índices mitóticos de uma mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste do χ^2 .

Tabela 2. Número de pontes anáfasicas e telofásicas, células micronucleadas e total de aberrações celulares encontradas em cada CO e nas doses de 5 e 10 g de cúrcuma e urucum, nos tempos de exposição de 24 e 48h.

Aditivo/Dose (g)	TE	Pontes em Anáfase e Telófase	Células Micronucleadas	IM (%)
Urucum 10,0	CO	00	00	00 ^a
	24h	03	26	29 ^b
	48h	05	28	33 ^b
Urucum 5,0	CO	00	00	00 ^a
	24h	05	20	25 ^b
	48h	03	21	24 ^b
Cúrcuma 10,0	CO	00	00	00 ^a
	24h	02	15	27 ^b
	48h	01	29	30 ^b
Cúrcuma 5,0	CO	00	00	00 ^a
	24h	04	15	19 ^b
	48h	03	13	16 ^b

CO – Controle; TE – Tempo de exposição. Médias seguidas da mesma letra entre linhas dentro uma mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste do χ^2 .

comparados os IM entre os TE de uma mesma dose verificou-se que os mesmos não foram estatisticamente significativos entre si.

Na *Tabela 2*, é apresentado o número de células com pontes em anáfases e telófases, células micronucleadas, e o total de aberrações celulares presentes nas células de tecido meristemático de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com os aditivos urucum e cúrcuma, nos TE 24 e 48h.

Os extratos de cúrcuma e de urucum nas duas doses e nos dois tempos de exposição avaliados apresentaram um número de aberrações celulares estatisticamente significativas pelo teste do Qui-quadrado com nível de significância igual a 5% em relação aos seus controles. Porém, quando confrontado os valores obtidos de aberrações entre os dois tempos de exposição, em cada dose avaliada, observou-se que o resultado obtido não foi estatisticamente significativo para nenhum dos aditivos por este teste estatístico com os mesmo nível de significância.

Discussão

A substituição crescente dos aditivos alimentares sintéticos por aqueles de origem natural exige que os estudos toxicológicos disponíveis para os estudos de avaliação de risco à saúde humana e animal sejam tão bem definidos quanto os dos aditivos sintéticos. Segundo Orsolin e Nepomuceno (2009), o uso adequado do cúrcuma e urucum trazem muitos benefícios ao organismo. Porém, de acordo com Volp *et al.* (2009), ainda não se sabe o quanto o uso indiscriminado destes dois aditivos pode ser prejudicial, visto que, seus efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos ainda não foram estabelecidos de forma satisfatória em função dos poucos estudos realizados até o momento avaliando-os em nível celular.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que estes dois aditivos tiveram ação antiproliferativa à ponta de raízes de *A. cepa* já no TE 24h, e, como pode se visto, esta inibição se acentuou no TE 48h. Para os dois aditivos, as doses testadas induziram aberrações cromossômicas em número significativo nas células do sistema teste utilizado. Assim, nas condições analisadas, as duas doses testadas do cúrcuma e do urucum foram citotóxicas as células meristemáticas de raízes de cebola.

Não foram encontrados na literatura estudos de avaliação de toxicidade em nível celu-

lar usando diretamente o macerado bruto de cúrcuma obtido a partir da trituração de suas sementes. Os estudos encontrados foram avaliando apenas a curcumina, como o realizado por Mukhopadhyay et al. (1998) que avaliaram a ação da curcumina isolada em células de medula óssea de camundongos e verificaram que estes compostos na superdosagem de 5mg, tiveram ação citotóxica e mutagênica.

Antunes et al. (1999) verificaram em células de ovário de hamster chinês que doses acima de 2mg, consideradas super-dosagens para o sistema teste utilizado, de curcumina isolada induziram alterações cromossômicas em número significativo neste sistema-teste. Estes pesquisadores ainda observaram um aumento, estatisticamente significativo, de micronúcleos quando as mais elevadas doses de curcumina foram associadas com a desoxirribomocina, uma droga clastogênica. Em 2009, Orsolin e Nepomuceno observaram que doses acima de 5mg do extrato de cúrcuma foi carcinogênica a *Drosophila melanogaster*, a popular mosca da fruta. Estes resultados de toxicidade em nível celular com a curcumina corroboram aos resultados obtidos aqui neste trabalho com doses elevadas do extrato bruto da cúrcuma em *A. cepa*.

Já em relação ao urucum, da mesma forma que para o cúrcuma, não foram encontrados estudos de avaliação de toxicidade em nível celular usando diretamente o macerado bruto deste aditivo e sim somente com a bixina e a norbixina isoladas, como o realizado por Agner et al. (2005) que induziram danos ao DNA de ratos com o clastogênico N-dietil nitrosamina, e após o tratamento com a bixina, em dose normal de ingestão, verificaram que a mesma não aumentou os danos a esta molécula.

Em outro estudo, Lima et al. (2003), por meio de um tratamento subcrônico de sete dias, incluíram doses, entre 1,5 a 3,0mg, consideradas ideais para o bioensaio utilizado, do aditivo urucum na dieta de camundongos, e verificaram que o mesmo não teve ação antiproliferativa e nem mutagênica. Estes resultados não corroboram aos obtidos neste trabalho, porém, é importante destacar que as dosagens utilizadas aqui em *A. cepa* são consideradas elevadas, diferentemente das dosagens testadas, que foram consideradas ideais para os sistemas testes das pesquisas relatadas. Outro ponto importante é que nos trabalhos citados somente a curcumina foi avaliada, e neste trabalho utilizou-se o extrato bruto que continha

todos os componentes químicos da semente. Segundo Antunes et al. (2005), dados toxicológicos em nível celular do aditivo urucum ainda são considerados escassos. Estes mesmos autores afirmam que os valores da IDA deste aditivo alimentar são grandemente ultrapassado em países da América do Sul e América Latina, necessitando de maior atenção dos pesquisadores em avaliar o potencial tóxico do mesmo.

Dessa forma, os resultados obtidos aqui somados aos já disponíveis na literatura sobre a toxicidade em nível celular destes dois aditivos podem servir de norteadores aos profissionais da área da saúde e aos comitês responsáveis pelo estabelecimento das IDA, como por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AN-VISA) na delimitação de quantidades ideais de utilização destes aditivos alimentares, bem como estimular a realização de novas pesquisas sobre a avaliação de toxicidade em nível celular do urucum e do cúrcuma.

Os resultados obtidos na presente pesquisa também reforçam a importância do sistema-teste *A. cepa*, já que o mesmo apresenta muitas vezes, resultados semelhantes aos resultados obtidos com outros bioensaios. Também é importante ressaltar, conforme citado por Fachinneto et al. (2007) e Peron et al., (2008) que mesmo que o metabolismo vegetal seja diferente dos bioensaios com animais e com cultura de células, os resultados obtidos por este organismo de prova são excelentes parâmetros de análise citotóxica, e o mesmo tem sido muito utilizado como indicativo para prevenir a população humana sobre o consumo de determinados alimentos e medicamentos sintéticos e naturais.

Conclusão

Outros trabalhos avaliando a toxicidade em nível celular do urucum e do cúrcuma devem ser realizados para se somarem aos já existentes e assim estabelecer, com propriedade, sua real ação em nível celular. Os resultados obtidos aqui, apesar de preliminares, indicam que, no momento, a utilização destes dois aditivos alimentares pela população, de forma indiscriminada, requer cautela.

Referências

Agner A.R., Bazo A.P., Ribeiro L.R., Salvadori D.M. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (Bixa orella-

na L.) in rat colon carcinogenesis. Mut Res. 2005;582:146-54.

Antunes L.M., Araújo M.C., Dias F.L., Takahashi CS. 1999. Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. Teratog Carcinog Mutagen. 1999;191:1-8.

Antunes L.M., Pascoal L.M., Bianchi M.L., Dias FL. 2005. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocytes cultures. Mut Res. 2005;585:113-9.

Avancini C., Wiest J.M., Dalla'Agnol R., Haas J.S., Von Poser G.L. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. Lat American J Pharm. 2008;27:894-99.

Ayres M., Ayres J.R.M., Ayres D.L., Santos A.S. BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. CNPq: Brasília, 2007.

Bautista A., Miranda M.S., Batista M.S., Moreira E.L.T., Silva I.M., Gomes I.C.S. 2004. Avaliação da toxicidade oral subcrônica da bixina para ratos. Braz J Pharm Sci. 2004;40:10-14.

Bulku E., Stohs S.J., Cícero L., Brooks T., Halley H., Ray S.D. Curcumin exposure modulates multiple pro-apoptotic signaling pathways to antagonize acetaminophen-induced toxicity. Curr Neurovasc Res. 2012;9: 58-71.

Caritá R., Marin-Morales M.A. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere 2008;72:722-25.

Cheeseman M.A. 2012. Artificial food color additives and child behavior. Environ Health Perspect. 2012;20:15-16.

Ejaz A., Wu D., Kwan P., Meydani M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. J Nut 2009;139:919-25.

Fachinetto J.M., Bagatini M.D., Durigon A.C. F.S., Tedesco S.B. 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC

(Asteraceae) sobre o ciclo de celular de *Allium cepa*. Rev Bras Farmacog. 2007;17: 49-54.

Feng J., Cerniglia C.E., Chen H. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. Front Biosci (Elite Ed.) 2010;4:568-586.

Grant W.F. 1999. Chromosome aberration assays in *Allium*. Mut Res. 1999;99:273-291.

Guerra M., Souza M.J. 2002. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

Herrero O., Perez J.M.M., Fernández P.F. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. Mut Res. 2012;7431: 24-34.

Kim J.H., Gupta S.C., Park B., Yadav U.R., Aggarwal B.B. 2012. Tumeric (*Curcuma longa* L.) unhibits inflammatory nuclear factor (NF) – kB and NF-kB- regulated gene products and induced chemosensitization and suppressed osteoclastogenesis. Mol Nutr Food Res. 2012;563: 454-65.

Leme, D.M., Marin-Morales M.A. 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. Mut Res. 2008;650:80-86.

Lima R.O.A., Azevedo L., Ribeiro L.R, Salvadori D.M. 2003 Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse boné marrow cells. Food Chem Toxicol. 2003;41:189-192.

Mahfouz M.M., Zhou Q., Kummeron F.A. Effect of curcumin on LDL oxidation *in vitro* and lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cholesterol fed rabbits. Int J Vitam Nutr Res. 2011;81:378-371.

Matsumoto S.T., Mantovani M.S., Malagutti M.I.A., Dias A.L., Fonseca I.C., Marin-Morales M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. Gen Mol Biol. 2006;29:148-158.

Mukhopadhyay M.J., Saha A., Mukherjee A. Studies on the anticlastogenic effect of turmeric and curcumin on cyclophosphamide and mitomycin C *in vivo*. Food Chem Toxicol. 1998;36:73-76.

Orsolin P.C., Nepomuceno J.C. 2009. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. Rev N Int Pesq Ext UNIPAM. 2009;6:55-69.

Pan R, Qiu S, Lu DX, Dong J. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. Chin Med J. 2008;121:832-839.

Peron A.P., Marcu M.C., Vicentini V.E.P. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia vahl* em sistema teste vegetal. Arq Ciên Saúde Unipar. 2008;12:1-10.

Polar-Cabrera K., Huo T., Schwartz S.J., Faila M.L. Digestive stability and transport of norbixin, a 24 carbon carotenoid, across monolayers of caco-2 cells. J Agric Food Chem. 2010;58:5789-5794.

Reddy M.K., Alexander-Lindo R.L., Nair M.G. 2005. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food color. J Agric Food Chem. 2005;53:9268-9273.

Resolução RDC n. 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. 2005. BRASIL. [on-

-line]. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Consulta em 10 outubro de 2012]. Disponível em: <<http://www.e-legis.anvisa.gov.br>>.

Sabini M.C., Cariddi L.N., Escobara F.M., Bachetti R.A., Sutil S.B., Contigiani M.S., Zanon S.M., Sabini L.I. 2011. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. Nat Prod Commun. 2011;6:995-998.

Santos G.S., Mendonça L.M., Antonucci G.A., Santos A.C., Antunes L.M., Bianchi M.L. 2012. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12. J Agricultural Food Chem. 2012;50:335-340.

Sayed H.M., Foudad D., Ataya F.S., Hassan N.H., Fahmy M.A. The modifying effect of selenium and vitamins A, C and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. Mut Res. 2012;744:145-53.

Tsuruma K., Shimazaki H., Nakashima K., Yamauchi M., Sugitani S., Shimazawa M., Linuma M., Hara H. 2012. Annatto prevents retinal degeneration induced by endoplasmic reticulum stress *in vitro* and *in vivo*. Mol Nutr Food Res. 2012;56:713-724.

Volp A.C.P., Renhe I.R.I., Stringueta P.C. 2009. Natural bioactive pigments. Alim Nut. 2009;20:157-166.

Wrolstad R.E., Culver C.A. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. Annu Rev Food Sci Technol. 2011;3:59-77.

Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário *in vitro* do α -pineno e carvacrol

Cytotoxic and antiparasitic *in vitro* activities of α -pinene and carvacrol

Sobral-Souza, Celestina E.¹; Leite, Nadghia F.¹; Brito, Dara I.V.¹; Lavor Anne K.L.S.¹; Alencar, Liscássia B.B.¹; Albuquerque, Rosimeire S.¹; Ferreira, João Victor A.¹; Freitas, Maria A.¹; Matias, Edinardo F.F.¹; Andrade, Jacqueline C.¹; Tintino, Saulo R.¹; Morais-Braga, Maria F.B.¹; Vega, Celeste.²; Coutinho, Henrique D.M.^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri. ²Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay.

*hdmcoutinho@gmail.com

Recibido: 3 de abril de 2013

Aceptado: 9 de noviembre de 2013

Resumo. A leishmaniose e a doença de Chagas tem sido um grande desafio, no que diz respeito à sua terapêutica. Devido à grande dificuldade de encontrar fármacos que garantam uma ação terapêutica eficiente e menos agressora à espécie humana, diferentes produtos naturais vêm sendo testados. Muitas espécies vegetais foram investigadas quanto à sua ação leishmanicida e tripanocida na expectativa de que seus compostos metabólicos possuam atividade antiparasitária e ausência ou baixa citotoxicidade. Neste estudo sobre bioatividade do α -pineno e carvacrol, avaliaram-se os potenciais leishmanicida e tripanocida. O carvacrol apresentou um percentual de inibição de 38,34% e 74,12% para as formas promastigotas e epimastigotas respectivamente, na concentração de 100 μ g/mL, apresentando uma citotoxicidade de 21,62%. O α -pineno apresentou 100% e 5,30% de inibição para as formas epimastigota e promastigota na concentração de 100 μ g/mL, com citotoxicidade de 87,88%.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida; Atividade tripanocida; Citotoxicidade, α -pineno.

Abstract. Leishmaniasis and Chagas Disease represent a great challenge against the modern therapeutics. Due the high difficult to find new drugs with therapeutic efficacy and low toxicity, several natural products had been screened. Many species of plants were investigated about their leishmanicidal and trypanocidal activities. Some phytocompounds are the α -pinene and carvacrol. In this work, we evaluated the bioactivities of α -pinene and carvacrol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania braziliensis* cell lines. The carvacrol inhibited 38,34% and 74,12% of the promastigote and epimastigote forms, respectively at 100 μ g/mL, showing a low cytotoxic activity (21,62%). The α -pinene inhibited 100% and 5,30% against the epimastigote and promastigote forms respectively, at 100 μ g/mL, showing a higher cytotoxic activity (87,88%).

Keywords: Leishmanicidal activity; Trypanocidal activity; Cytotoxic activity, α -pinene.

Introdução

Doenças parasitárias são de elevada incidência em países em desenvolvimento, a leishmaniose e doença de Chagas tem sido um grande desafio, no que diz respeito à sua terapêutica, pois além de tais doenças não despertarem o interesse das indústrias farmacêuticas, as drogas existentes para seus tratamentos apresentaram elevada toxicidade (WHO 2003; MS 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tripanossomíase e a leishmaniose, estão entre as doenças infecto-parasitárias que mais preocupam os órgãos de saúde pública,

pela frequência, e principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que podem acarretar (WHO 2004).

As leishmanioses são um grupo de doenças, causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Trypanosomatidae). São transmitidos ao homem e a outros mamíferos através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia* spp na América do Sul, enquanto que no Velho mundo, a transmissão é feita através de mosquitos de gênero *Phlebotomus*. A doença se apresenta de diversas formas clínicas, podendo aco-

meter a pele, as mucosas e as vísceras. No Brasil, existem sete espécies distintas do parasito sendo que, destas, seis (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. shawii*, *L. naiffi*) são responsáveis pela leishmaniose cutânea e mucocutânea (LMC) – sendo essas formas compreendidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – e uma espécie (*L. chagasi*) responsável pela leishmaniose visceral (Genaro e Reis 2005; Morais-Braga *et al.* 2013; Santos *et al.* 2013).

A doença de Chagas afeta principalmente pessoas pobres nos países em desenvolvimento, devido às condições saneamento básico e higienização. Pouco tem sido investido em diagnóstico e tratamento - apesar de uma intensa pesquisa sobre a doença (Morais-Braga *et al.* 2013; Santos *et al.* 2013). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas com Chagas nas Américas, 2 milhões delas só no Brasil. Mais de 10.000 morrem a cada ano como resultado. A vigilância constante é necessária para lidar com a doença de Chagas: controle do vetor, a melhoria da habitação, acessíveis cuidados médicos, sangue-seleção de programas, e no tratamento de indivíduos já infectados (WHO 2010). A transmissão da doença de Chagas por rotas alternativas, como a ingestão de alimentos contaminados, vem ganhando espaço como preocupação em saúde pública (IOC 2011).

Devido à grande dificuldade de encontrar fármacos que garantam uma ação terapêutica eficiente e menos tóxica ao hospedeiro, diferentes produtos naturais vêm sendo estudados. Muitas espécies vegetais foram investigadas quanto à sua ação leishmanicida e tripanocida (Ruiz *et al.* 2004; Mesquita *et al.* 2005) na expectativa de que seus compostos metabólicos possuam atividade antiparasitária e ausência ou baixa citotoxicidade. Substâncias isoladas também são objetos de estudo de pesquisadores que buscam descobrir novos agentes terapêuticos para o tratamento destas doenças (Coro *et al.* 2005; Saraiva *et al.* 2005; Roldos *et al.* 2008).

O carvacrol é um dos componentes mais comuns de óleos essenciais, tendo sido aprovado como um seguro aditivo alimentar nos EUA e Europa (CEC 1999; CFSAN 2006). O carvacrol é eficaz contra bactérias, leveduras, fungos, insetos e ácaros (Dorman e Deans 2000; Bem Chami *et al.* 2005; Arfa *et al.* 2006; Jeong *et al.* 2008; Kordali *et al.* 2008).

O α -pineno, presente em alguns óleos essenciais, apresenta atividade larvicida, detergen-

te, inseticida (Simas *et al.* 2004), assim como propriedades atrativas para insetos. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial antiparasitário in vitro de terpenóides componentes de óleos essenciais, o α -pineno e carvacrol, contra as formas epimastigota e promastigota de *T. cruzi* e *L. braziliensis*, bem como verificar sua citotoxicidade em células de mamíferos.

Materiais e métodos

Linhagens celulares utilizadas

Nos testes in vitro de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Le Senne *et al.* 2002). Os parasitas, transfectados de forma estável com o gene para a β -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28°C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) (Roldos *et al.* 2008). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania* spp. foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay – IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. Seguiram os procedimentos descritos por Roldos *et al.* (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivada a 22°C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20 %.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em *Minimal Essential Medium* (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10 %), penicilina G (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Martins *et al.* 2009).

Reagentes

Resazurina sódica foi obtida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4°C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com

tampão fosfato 1 %, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0,9 % (pH 7,4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofre S.A., Barcelona, Spain) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

Teste de atividade anti-epimastigota

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial. Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de 1×10^5 mL⁻¹ em 200 μ l de *Liver Tryptose Broth* (LT) medium. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 μ g/ml a 28°C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 μ l da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μ M. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6 h a 37°C e foram submetidas a visualização sob 595 nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade anti-epimastigota (AE%).

Teste de atividade anti-promastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas até uma concentração de 106 células/ml e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade

dos compostos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado.

Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em microplacas de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5 % de CO₂. Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μ l, sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 μ l de uma solução de resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3 h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

Resultados

De acordo com os resultados da *tabela 1*, o α -pineno apresentou uma baixa citotoxicidade na concentração de 50 μ g/ml, já o carvacrol não demonstrou citotoxicidade na mesma concentração.

Na avaliação da atividade antiparasitária, α -pineno apresentou 100 % de inibição em *L. braziliensis* na concentração de 100 μ g/ml, dado importante visto que uma inibição neste nível é considerada clinicamente relevante. Em relação a *T. cruzi* a inibição foi de 5,30 % apresentando uma citotoxicidade de 87,88 %.

Já o carvacrol apresentou 38,34 % e 74,12 % de inibição em *T. cruzi* e *L. braziliensis* respectivamente, em 100 μ g/ml.

Tabela 1. Atividade anti-epimastigota *T. cruzi*, atividade antipromastigota *L. braziliensis* e citotoxicidade.

Substância	Concn (μ g/ml)	Cytotoxicity (%C)	Antiparasitic activity	
			<i>T. cruzi</i> (%AP)	<i>L. braziliensis</i> (%AE)
α -pineno	100	87,88	5,30	100
	50	2,21	0	91,76
	25	-	-	3,9
	12,5	-	-	0
	6	-	-	0,43
Carvacrol	100	21,62	38,34	74,12
	50	0	23,66	42,35

%C - Percentual de fibroblastos NCTC929 mortos; %AE - porcentagem de inibição epimastigota,

%AP - porcentagem de inibição promastigota.

Discussão

O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada pela técnica de corantes vitais como o vermelho neutro, que possibilita a distinção entre células vivas e danificadas ou mortas (Sülsen *et al.* 2007). Neste estudo, a verificação da viabilidade celular foi realizada usando o corante resazurina.

Segundo o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar os efeitos tóxicos em modelos animais, depois de comprovada a sua não toxicidade o estudo pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (Rogerio *et al.* 2003). Os resultados mostraram que o carvacrol não apresentou citotoxicidade na concentração de 50 µg/ml, para essa mesma concentração o α -pineno demonstrou uma baixa citotoxicidade e uma eliminação de 91,76 % da forma epimastigota. Contudo, mais estudos com o carvacrol, principalmente ampliando as faixas de concentrações testadas são necessários antes de realizar testes *in vivo*.

Atualmente as drogas utilizadas para parasitos como *T. cruzi* e *L. braziliensis* apresenta uma alta toxicidade porque metabólitos produzidos comprometem tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade (Dias *et al.* 2009).

Os resultados obtidos indicam que o α -pineno e o carvacrol foram eficazes contra as cepas de parasitos testadas apresentando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *L. brasiliensis*. Em se tratando da citotoxicidade novos testes devem ser realizados já que os níveis foram elevados, viabilizando futuros ensaios *in vivo*.

Referências

Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalié P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43:149–154.

Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2006. EAFUS: a Food Additive Database. Washington, DC: US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2006.

Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral*

Microbiol Immunol. 2005;20:106–111.
Commission of the European Communities.

Commission Decision of 23 February 1999 Adopting a Register of Flavouring Substances Used in or on Foodstuffs Drawn Up in Application of Regulation (EC) No. 2232–2296, 1999.

Coro J., Pérez R., Rodríguez H., Suárez M., Veja C., Rolón M., Montero D., Nogalc J.J., Gomez-Barrio A. Synthesis and antiprotozoan evaluation of new alkyl-linked bis(2-thioxo-[1,3,5]thiadiazinan-3-yl) carboxylic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemi.* 2005;13:3413–3421.

Dias L.C., Dessoy M.A., Silva J.J.N., Thiemann O.H., Oliva G., Andricopulo A.D. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quim Nova.* 2009;32:2444–2457.

Dorman H.J.D., Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88:308–316.

Genaro O., Reis A.B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves D. P., editor. *Parasitologia Humana.* São Paulo: Atheneu; 2005, p. 47-66.

Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Desafios contemporâneos da doença de Chagas na Amazônia. [on-line] [Acessado em 23/novembro/2011]. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1341&sid=32>>

Jeong E.Y., Lim J.H., Kim H.G., Lee H.S. Acaricidal activity of *Thymus vulgaris* oil and its main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *J Food Prot.* 2008;71:351–355.

Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M., Mete, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol.* 2008;99:8788–8795.

Le Senne A., Muelas-Serrano S., Fernandez-Portillo C., Escario J.Á., Gómez-Barrio A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:1101–1105.

Martins M.D., Marques M.M., Bussadori S.K., Mesquita-Ferrari R.A., Pavesi V.C.S., Wadt N.S., Fernandes K.P. Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). *ConScientiae Saúde*. 2009;8:99-104.

Mesquita M.L. de, Desrivot J., Bories C., Fournet A., Paula J.E., Grellier P., Espindola L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):783-787.

Ministério da Saúde do Brasil. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Texto de difusão técnico-científico do Ministério da Saúde. *Rev. Saúde Pública*. 2010;44:200-202.

Morais-Braga M.F.B., Souza T.M., Santos K.K.A., Guedes G.M.M., Andrade J.C., Vega C., Rolón M., Costa J.G.M., Saraiva A.A.F., Coutinho H.D.M. Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae). *Experimental Parasitology*, 2013;134:178-182.

Rogero S.O., Lugão A.B., Ikeda T.I., Cruz A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre duas Metodologias. *Materials Research*, 2003;6:317-20.

Roldos V., Nakayama H., Rolón M., Montero-Torres A., Trucco F., Torres S. Veja, C., Marro-Ponce Y., Huguaburu V., Yaluff G., Gómez-Barrio A., Sanabria L., Ferreira M.E., Arias A.R., Pandolfi E. Activity of a hydroxybenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. *J Med Chem*. 2008;43:1797-1807.

Ruiz P.G., Garavito G., Acebey C.L., Arteaga L., Pinzon R., Gimenez T.A. Actividad Leishmanicida y Tripanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia. *Biofarbo*. 2004;13:27-32.

Santos K.K.A., Rolón M., Vega C., Rojas de Arias A., Costa J.G.M., Coutinho H.D.M. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2013;34:47-50.

Saraiva J., Vega C., Rolon M., Silva R., Silva M., Donato P., Bastos J., Gomez-Bairro A., Albuquerque S. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Res*. 2007;100:791-795.

Simas N.K., Lima E.C., Conceição S.R., Kuster R.M., Oliveira-Filho A.M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim Nova*. 2004;27:46-49.

Sülsen V.P., Cazorla S.I., Frank F.M., Redko F.C., Anesini C.A., Coussio D.J., Malchiodi E.L., Martino V.S., Muschietti L.V. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Flavonoids from Argentine Medicinal Plants. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:654-659.

World Health Organization (WHO). 2004. Communicable Disease Surveillance and Response. [on-line]. [Acessado em 20 janeiro de 2004]. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>>.

World Health Organization (WHO). International Workshop, Intensified control of neglected diseases, Summary Report, 10-12 [on-line]. [Acessado em 09 Dezembro de 2003]. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_CEE_2004.45.pdf>

World Health Organization (WHO). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. [on-line]. [Acesso em: 20 de julho 2010]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf

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

Optimización en la recuperación de inmunoglobulinas, como molécula entera y fragmento F(ab)₂, en la producción de antivenenos

Optimization in the immunoglobulins recovery, as whole molecule and F(ab)₂ fragment, in the antivenim production

Litwin, Silvana^{1*}; Isabettini, Alberto Oscar¹; Calderón, Leandro²; Varni, Liliana Mónica¹

¹Servicio Sueros Terapéuticos. Instituto Nacional de Producción de Biológicos – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”. Vélez Sarsfield 563. CP 1281. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. ²Laboratorio de Control de Biológicos. Instituto Nacional de Producción de Biológicos – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”. Vélez Sarsfield 563. CP 1281. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

Recibido: 22 de noviembre de 2013

Aceptado: 14 de diciembre de 2013

Resumen. En la actualidad se utilizan, principalmente, dos métodos de purificación de anticuerpos a partir de plasmas equinos hiperinmunes para la producción de antivenenos a nivel industrial, obteniéndose preparaciones enriquecidas en moléculas de inmunoglobulinas G ó fragmentos F(ab)₂. Con ambos métodos, luego de la precipitación, se observa una importante pérdida de capacidad neutralizante en comparación con la capacidad neutralizante de los plasmas de partida. En este trabajo, se realizó el fraccionamiento de plasmas equinos hiperinmunes utilizando ácido caprílico con y sin digestión enzimática con pepsina. El objetivo del trabajo fue dar a conocer la proporción de recuperación de la capacidad neutralizante luego del fraccionamiento; resultando ésta menor cuando el plasma se trató enzimáticamente. Adicionalmente, se propuso establecer cuál sería la etapa responsable de la diferencia en la recuperación de anticuerpos entre una metodología y otra.

Cuando se purificaron las inmunoglobulinas enteras, se recuperó aproximadamente un 53% de la capacidad neutralizante mientras que cuando la muestra se purificó luego de ser tratada enzimáticamente, se obtuvo alrededor del 30% de esa actividad. Una relación de similar magnitud se verifica en la recuperación de la masa de proteínas solubles luego de remover los contaminantes, entre una metodología y otra. La insolubilización del fragmento Fc generado durante la digestión sería el responsable de esa pérdida adicional de proteína y capacidad neutralizante.

Palabras clave: Antiveneno; Recuperación; Ácido caprílico; Inmunoglobulina

Abstract. Today two methods are mainly used for the purification of antibodies from hyperimmune equine plasma at industrial level obtaining enriched preparations of immunoglobulin G (IgG) molecules or F(ab)₂ fragments.

In both methods, after the precipitation, an important loss in the neutralizing capability was observed compared to the one of the original plasma. In this work, we performed the fractionation of hyperimmune equine plasma using caprylic acid, with and without enzymatic digestion with pepsin. The aim was to explain the percentage of recovery of the neutralizing capability after the fractionation; which resulted minor when the plasma was enzymatically treated. Additionally, we intended to establish which stage, in the purification process, was the responsible for the difference in the antibody recovery between one methodology and the other. When entire immunoglobulins were purified, approximately 53% of the neutralizing capacity was recovered, but when the sample was purified after the enzymatic treatment, around the 30% of the activity was obtained.

A ratio of similar magnitude is verified on the recovery of the soluble protein mass after the removal of contaminants, between the two methods.

The insolubilization of the fragment Fc generated during digestion would be responsible for the additional loss of protein and neutralizing capacity.

Key words: Antivenom; Recovery; Caprylic acid; Immunoglobulin

Introducción

En ciertas regiones del mundo, los accidentes provocados por la mordedura de serpientes venenosas son muy frecuentes y causan un alto número de muertes y discapacidades físicas (Theakston y col. 2003).

Desde hace más de un siglo, la utilización de

antivenenos se ha constituido como el único tratamiento efectivo contra las mordeduras de serpientes y otros animales venenosos (Calmette 1894; Chaippaux y Goyffon 1998; Theakston y col. 2003).

El animal de elección para la producción de antivenenos ofídicos y aracnídicos fue y es el

caballo. En estos animales, las inmunoglobulinas G que se observan mayormente en animales hiperinmunizados son del isotipo IgG(T), las cuales están altamente glicosiladas y presentan más inmunogenicidad que otros isotipos (Theakston y col. 2003; Sjostrom y col. 1994).

En sus inicios, para los tratamientos contra mordeduras de serpientes, se utilizaba el suero completo proveniente de equinos hiperinmunes (Calmette 1894). Este suero era eficaz en su capacidad terapéutica pero generaba un alto número de reacciones adversas, tales como reacciones de hipersensibilidad inmediata (anafilaxia) en individuos alérgicos e hipersensibilidad tardía (enfermedad del suero) así como reacciones anafilactoideas debido a la alta concentración de proteínas heterólogas.

Años más adelante, con el objeto de disminuir estas reacciones, el suero fue sufriendo otro tipo de procesos con los cuales se lograba la eliminación de albúmina, globulinas no inmunes y otras proteínas del suero, quedando así, como agente terapéutico la molécula de inmunoglobulina G (IgG) purificada. Más recientemente, se dio a conocer que estas inmunoglobulinas podían ser tratadas química o enzimáticamente con el objeto de disminuir la ocurrencia de reacciones adversas (de Roodt y col. 2009).

La digestión enzimática puede realizarse con la utilización de papaína o pepsina. Con la primera se obtienen fragmentos Fab mientras que con la segunda, se obtienen fragmentos F(ab)₂. La pepsina es una enzima de 35 kDa que preferentemente cliva las uniones C-terminal de Phe, Leu y Glu. Su actividad óptima se encuentra en valores de pH de 2 a 4, y es irreversiblemente inactivada a pHs mayores de 6 (Harlow y Lane 1988).

Uno de los métodos de fraccionamiento más utilizados es el basado en los desarrollos de Pope (1938; 1939 a; 1939 b) y Harms (1948) en los cuales se logra la obtención de fragmentos F(ab)₂ por digestión enzimática de las IgG y su posterior fraccionamiento del plasma equino hiperinmune, utilizando sulfato de amonio.

Otro método utilizado para el fraccionamiento de plasma equino hiperinmune, más recientemente adoptado por algunos países, es el de la precipitación diferencial de proteínas plasmáticas no inmunoglobulínicas mediante el agregado de ácidos grasos de cadena corta (Steinbush y Adruan 1969), siendo el ácido caprílico el de elección. Por esta técnica se obtienen, a partir de plasma equino hiperinmune, moléculas de IgG de alta pureza.

Algunos autores han estudiado la optimización de las condiciones físico-químicas (pH, concentración de ácido caprílico agregado y tiempo de agitación) durante la etapa de precipitación del plasma equino hiperinmune, de manera de obtener un filtrado altamente enriquecido en inmunoglobulinas (Rojas y col. 1994; Nudel y col. 2012). Morais y Massaldi (2012) han reportado que el efecto del ácido caprílico es debido a una interacción directa, a través de sitios específicos, con la proteína que precipita. Se genera así una superficie altamente hidrofóbica en la proteína, disminuyendo la interacción con el agua del medio y la solvatación que lo mantiene soluble. Por esto, se produce un aumento de la interacción proteína-proteína, causando asociación y precipitación de los complejos macromoleculares.

En comparación con los antivenenos obtenidos mediante precipitación con sulfato de amonio, se ha observado que aquellos fraccionados con ácido caprílico fueron superiores en términos de recuperación, relación albúmina/globulina y potencia neutralizante contra varias actividades del veneno a la vez que presentaron menor turbidez y cantidad de agregados proteicos (Rojas y col. 1994).

Si bien el fraccionamiento de antivenenos con ácido caprílico en comparación con la precipitación salina, presenta ventajas tanto en la recuperación de las inmunoglobulinas de interés, como en los bajos costos y tiempos de trabajo, tiene en su contra que, en general, el agente terapéutico purificado es una inmunoglobulina G completa (de Roodt y col. 2010).

La presencia del fragmento Fc ha sido señalada como una importante causa de reacciones adversas, mediante reacciones de hipersensibilidad de tipo I y activación del complemento (Morais y Massaldi 2009).

En el presente trabajo nuestro grupo tiene como objetivo comparar, en términos de porcentaje de recuperación de masa proteica y capacidad neutralizante, antivenenos obtenidos por precipitación con ácido caprílico, conteniendo moléculas de IgG entera y antivenenos obtenidos como resultado de combinar la técnica de precipitación de plasma equino hiperinmune con ácido octanoico y la digestión enzimática de las moléculas de IgG con pepsina para obtener fragmentos F(ab)₂.

Materiales y métodos

Equinos. Para el plan de inmunización se utilizaron diez equinos mestizos tipo doble pro-

pósito de 300 a 500 kg. de peso, en buen estado de salud ubicados en el predio del Servicio de Actividades Agropecuarias del Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB) de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán", sito en la localidad de Marcos Paz, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Venenos. Se utilizaron venenos de *B. alternatus* y *B. neuwiedii* obtenidos a partir de especímenes sanos provistos por el Serpentario del Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS, "Dr. Carlos G. Malbrán".

Los venenos fueron obtenidos por extracción manual, inmediatamente secados al vacío y almacenados a 4°C hasta su uso. La potencia letal (DL50) fue determinada utilizando el método de *Probit* (Farmacopeia Brasileira 2006).

Esquema de inmunización. Los equinos utilizados ya presentaban memoria hacia los venenos de modo que el plan de inmunización consistió en la inoculación de *boosters*. Los mismos fueron inoculados por vía subcutánea (s.c.) los días 1, 15, 30, 45 y 55 con 1,0 mg (la primera dosis), 3,0 mg (la segunda y tercer dosis) y 6,0 mg (las dosis restantes) de una mezcla de venenos en diferentes puntos en el lomo. Durante el protocolo de inmunización, el veneno fue inoculado con Adyuvante de Freund Incompleto (día 1) o sólo con NaCl 0,15 M (en los días restantes).

Control de la evolución de la respuesta inmune. Con el objeto de evaluar la evolución de la respuesta inmune, el *pool* constituido por las muestras individuales fue testado en ratones CF-1 de 18-20 g, enfrentando diferentes volúmenes del suero hiperinmune a controlar contra 5 DL50 del veneno. El sistema veneno - antiveneno fue incubado a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente inoculado por vía intraperitoneal (i.p.).

Para el manejo de los animales se siguieron los lineamientos éticos sugeridos por el National Research Council (2002).

Obtención del plasma hiperinmune. La sangre equina fue obtenida por punción de la vena yugular y recolectada en frascos de vidrio conteniendo 10 % v/v Citrato de Sodio al 20 %. Se dejó decantar el paquete globular y mediante la utilización de una bomba se extrajo el plasma hiperinmune que se colocó en un frasco acon-

dicionado. Se agregaron, como conservante, partes iguales de fenol - éter en una relación de 9 ml por litro de plasma.

Posteriormente, el plasma fue fraccionado para realizar los diferentes métodos de fraccionamiento y purificación de inmunoglobulinas.

Purificación de Inmunoglobulinas IgG. Inmunoglobulinas enteras fueron purificadas por fraccionamiento con ácido caprílico usando técnicas convencionales (Rojas y col. 1994), con modificaciones.

Brevemente, el plasma fue diluido a la tercera parte con NaCl 0,15 M, se ajustaron el pH y la temperatura a 4,8 y 30 °C, respectivamente. El ácido caprílico (ICN) se adicionó lentamente y con agitación vigorosa hasta completar un volumen equivalente al 5% del volumen del plasma original. Una vez terminada la adición se mantuvo en agitador en las mismas condiciones durante 1 hora.

La masa insoluble fue removida utilizando papel de filtro tipo Whatman. La solución filtrada se diafiltró contra PBS pH 7,2 y se concentró utilizando un cassette Pellicon 2 de 10 KDa, marca Millipore. Se agregaron Thimerosal 1/10000 y fenol 1/1000 como conservantes.

Al antiveneno obtenido se le realizaron determinaciones de proteínas y potencia neutralizante.

Purificación de los fragmentos F(ab)₂ de inmunoglobulinas. Los fragmentos F(ab)₂ fueron purificados a partir del plasma de acuerdo a lo descrito, adicionando un paso de digestión enzimática con pepsina.

Brevemente, el plasma fue diluido a la tercera parte con solución fisiológica. La fracción F(ab)₂ se obtuvo por digestión enzimática con pepsina 1/10000 (Parafarm) a pH 3,2, incubando durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente, el pH se ajustó a 6,5 por el agregado de NaOH 0,75 N, se mantuvo 15 minutos en estas condiciones y posteriormente se volvieron a ajustar el pH y la temperatura a 4,8 y 30 °C respectivamente. Se adicionó ácido caprílico (ICN) lentamente y con agitación vigorosa hasta completar un volumen equivalente al 5 % del plasma. Una vez terminada la adición, se mantuvo la agitación en las mismas condiciones durante 1 hora. El precipitado obtenido se filtró por papel de filtro tipo Whatman. La solución filtrada se diafiltró contra buffer PBS pH 7,2 y se concentró utilizando un cassette Pellicon 2 de 10 kDa, marca Millipore. Se agregaron Thimerosal 1/10000 y fenol 1/1000 como conservantes.

Al antiveneno obtenido se le realizaron determinaciones de proteínas y potencia neutralizante.

Diafiltración. Se utilizó un equipo de filtración tangencial marca Millipore modelo Pellicon 2 de acero inoxidable con cassettes de 0,5 m² de área y cut off de 10 kDa. Como unidad impulsora se utilizó una bomba peristáltica modelo BT, marca Masterflex con tubuladuras de silicona tipo Pharmed BT 86.

Determinación de proteínas. Las proteínas de los antivenenos fueron medidas con el método de Biuret usando el kit Proti II (Wiener).

Neutralización de la potencia letal de los antivenenos. Ratonés CF-1 de 18-20 g fueron enfrentados a diferentes volúmenes de cada antiveneno contra 5 DL₅₀ de cada veneno. El sistema veneno – antiveneno fue incubado a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente inoculado por vía intraperitoneal (i.p.).

A las 48 hs se registraron las muertes y se determinó la dosis efectiva 50% (expresada como la cantidad de veneno en microgramos que es neutralizado por 1 mililitro de antiveneno) mediante técnicas convencionales (WHO 1981; Theakston y Reid 1983; Farmacopeia Brasileira 2006).

Estudios de especificidad. Se realizaron por doble inmunodifusión en geles de agarosa enfrentando el antiveneno con anti IgG equina o anti suero total equino usando técnicas clásicas (Ministerio de Saúde 1996).

Estudios de pureza. Se realizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se sembraron 25 µg de cada muestra en geles al 7,5% de acrilamida / bis acrilamida siguiendo técnicas convencionales (Laemmli 1970).

Recuperación de la capacidad neutralizante. Se definió como recuperación de la capacidad neutralizante a la masa de veneno neutralizada por el antiveneno purificado respecto a la masa del mismo veneno neutralizado por el suero de origen.

Se determinó la potencia neutralizante por unidad de volumen del plasma equino hiperinmune y del antiveneno purificado. El porcentaje aproximado de recuperación de la capacidad neutralizante se expresó con la siguiente ecuación:

% Recuperación =	Volumen antiveneno x Título antiveneno	x 100
	Volumen total plasma x Título del suero	

Si bien el material de origen para el fraccionamiento es plasma equino, la titulación se realiza sobre una muestra de suero obtenida junto al plasma equino a utilizar.

Recuperación de la masa de proteínas. Se definió como recuperación de la masa de proteínas a los gramos de proteínas que permanecen en solución después de separar por precipitación y filtración aquellas proteínas que se insolubilizaron en presencia de ácido caprílico en esas condiciones. Se expresó como porcentaje respecto al total de proteínas.

Para poder comparar el porcentaje de recuperación de proteínas en cada metodología utilizada, se establece que a la concentración de proteínas de la muestra de IgG se la multiplique por 2/3 para descontar del valor de concentración proteica la influencia del fragmento Fc, de manera que esa diferencia de concentración represente las diferencias en el número de moléculas. El porcentaje de recuperación de la masa de proteínas se expresa con la siguiente ecuación:

% Recuperación =	Volumen antiveneno x % proteínas antiveneno	x 100
	Volumen plasma x % proteínas suero	

Resultados

Las potencias letales aplicadas por vía intraperitoneal de los venenos estudiados fueron 53 µg para el veneno de *B. alternatus* y 57 µg para el veneno *B. neuwiedii*.

El estudio de especificidad mostró una banda de precipitación cuando el veneno fue enfrentado con el suero anti IgG equina completa o el anti suero total equino, mostrando la pureza de los antivenenos obtenidos (Figura 1).

Surge del análisis electroforético que en los antivenenos enriquecidos en moléculas IgG enteras, aparece una banda de aproximadamente 150 kDa, la cual corresponde al peso molecular de la IgG. En los antivenenos obtenidos por precipitación por ácido caprílico y corte enzimático con pepsina, se ve la aparición de una única banda en el orden de los 100 kDa correspondiente a la masa molecular de la fracción F(ab)₂ (Figura 2).

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de recuperación de la masa de proteínas totales que quedaron en solución y la actividad neutralizante del antiveneno (expresado como la masa de veneno neutralizado por el antiveneno) luego del proceso de purificación (con o sin tratamiento enzimático), con respecto a la masa de



Figura 1. Estudio de especificidad del antiveneno por Doble Inmunoprecipitación en agarosa al 0,8 %. Se sembraron 15 μ l de cada muestra por pocillo. Se dejó difundir durante 48 hs. La tinción se realizó con Negro amido.

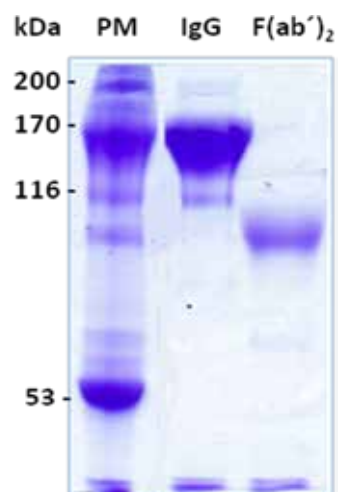


Figura 2. SDS-PAGE al 7,5 % de acrilamida-bisacrilamida en condiciones no reductoras. En cada calle se sembraron 25 μ g de proteína. PM: peso molecular; IgG: inmunoglobulina G; F(ab')₂: fragmento F(ab')₂.

Tabla 1. Porcentaje de recuperación de masa proteica y capacidad neutralizante de antivenenos conteniendo IgG entera o fragmentos F(ab')₂. Los resultados están expresados como la media \pm desvío estándar de los porcentajes de recuperación de masa proteica y capacidad neutralizante.

	Molécula entera IgG	Fragmento F(ab') ₂	Relación IgG/F(ab') ₂
MASA PROTEINAS (%)	34,6 \pm 3,5	18,8 \pm 2,9	1,84
Actividad neutralizante			
<i>B. alternatus</i> (%)	58,8 \pm 5,7	29,9 \pm 6,28	1,97
Actividad neutralizante			
<i>B. neuwiedii</i> (%)	52,5 \pm 9,2	27,3 \pm 9,62	1,92

proteínas y la actividad neutralizante presentes en el plasma sin purificar.

Se observó que, tanto en la masa de proteínas como en la actividad neutralizante, se obtiene una recuperación notoriamente menor cuando se obtiene el fragmento F(ab')₂ en comparación con los antivenenos conteniendo moléculas de IgG enteras. En este punto, cabe aclarar que los valores de las masas proteicas obtenidas luego de la digestión enzimática y la posterior precipitación, fueron corregidos de manera tal de no considerar al fragmento Fc, el cual precipita.

De estos resultados surge que prácticamente toda la pérdida de la capacidad neutralizante al tratar enzimáticamente las moléculas de IgG se explicaría por la generación de un precipitado adicional correspondiente al fragmento Fc cuando se precipitan los contaminantes luego del tratamiento con pepsina.

Al realizar la relación IgG / F(ab')₂ se observa que los valores obtenidos son muy similares, tanto para la masa de proteínas obtenida (1,84) como para la recuperación de la actividad neutralizante contra *B. alternatus* y *B. neuwiedii* (1,97 y 1,92 respectivamente).

Estos resultados muestran la relación que existiría entre la pérdida de proteínas activas en solución y la pérdida de la actividad neutralizante del antiveneno.

Entre ambas metodologías, la pérdida de proteínas sería responsable del 93 % de la pérdida de la capacidad neutralizante para el veneno de *B. alternatus* y del 96 % para el veneno de *B. neuwiedii*.

Discusión

Una de las metodologías más utilizadas para la obtención de antivenenos es la purificación de los anticuerpos del plasma equino hiperinmune utilizando como agente precipitante el ácido caprílico. Esta técnica tiene como fundamento la remoción de las proteínas plasmáticas insolubles en ácido caprílico a pH 4,8.

Cuando se purifica plasma equino a nivel industrial uno de los inconvenientes es la dificultad del proceso de filtración y la alta contaminación de la masa insoluble. La filtración se ve dificultada porque el precipitado tiene características de gran superficie y alta viscosidad, mientras que los fenómenos de contaminación de la masa insoluble se deben a dos factores principales: a) el arrastre mecánico, fenómeno de coprecipitación por el cual las impurezas solubles precipitan junto con las insolubles y b) la adsorción, fenómeno de post-precipitación por el cual las moléculas solubles se desplazan hacia el precipitado una vez que éste se ha formado. Es decir que a causa de ambos factores, se produciría el desplazamiento de los anticuerpos en solución hacia el precipitado.

Esto estaría dado porque las proteínas plasmáticas en solución se presentan como coloides hidrofílicos que, cuando pierden su solubilidad precipitan en forma de masa amorfa, de gran superficie y alta retención de aguas madres (Kolthoff 1965).

Cuando se purificaron inmunoglobulinas G enteras, la recuperación fue aproximadamente del 53 % de la capacidad neutralizante mientras que la recuperación fue de alrededor del 30 % cuando se obtuvo el fragmento $F(ab)_2$.

Esto significa que si un volumen de plasma equino hiperinmune neutraliza 100 μg de un veneno determinado, ese mismo plasma, eliminadas las impurezas neutralizará 53 μg de veneno y si el plasma es tratado enzimáticamente neutralizará alrededor de 30 μg de veneno, considerando que el veneno contra el cual se los compara es el mismo.

Al calcular la recuperación de la masa de pro-

teínas vemos que en el caso de la molécula IgG es de aproximadamente el 34%, mientras que cuando se recupera el fragmento $F(ab)_2$, el porcentaje es de alrededor del 18,5.

Algunos autores responsabilizan a las condiciones físico - químicas usadas durante la digestión enzimática como la causante del menor grado de recuperación de la capacidad neutralizante. Sin embargo, de acuerdo a estos valores, la pérdida de proteína ocurrida durante la etapa de filtración es de similar magnitud a la pérdida de la capacidad neutralizante, lo que podría sugerir que esa etapa sería la responsable de aproximadamente el 90 % de esta disminución. Esa pérdida adicional de proteínas cuando se purifican los anticuerpos tratados enzimáticamente radicaría en una mayor masa precipitada. Esa masa adicional correspondería al fragmento Fc generado durante la digestión e insoluble en ácido caprílico a pH 4,8.

Esta mayor cantidad de masa precipitada, debido a sus características de gran superficie, alta viscosidad y alta retención, produciría el arrastre de parte de las moléculas de inmunoglobulinas, llevando a una disminución de los valores de actividad neutralizante.

En trabajos anteriores encontramos que un aumento en la dilución del plasma antes de purificar permite recuperar mayor cantidad de anticuerpos. Sin embargo este aumento no es proporcional al grado de dilución (Datos no mostrados). Eso explicaría que la pérdida de anticuerpos no es debida solamente al agua incluida en la masa insoluble por atrapamiento mecánico sino que además, puede haber factores de adsorción en superficie, fenómeno éste que no se modificaría con la dilución.

En resumen, conociendo que la etapa de la precipitación y filtración es la "etapa crítica" causante de la pérdida de masa proteica activa y, por ende, de la capacidad neutralizante, sería posible obtener antivenenos conteniendo anticuerpos $F(ab)_2$ casi con el mismo grado de recuperación que la obtenida cuando se purifican moléculas de IgG a partir de plasmas equinos hiperinmunes. Para ello, se deben ajustar algunos parámetros durante esa etapa tales como diluir fuertemente el plasma antes de su fraccionamiento, disponer de la mayor superficie filtrante posible y/o incorporar adyuvantes para la filtración que disminuyan la superficie de la masa insoluble.

La obtención de un buen rendimiento de la actividad neutralizante luego de la purificación de plasmas equinos hiperinmunes, sumado a la

simplicidad de la técnica de precipitación por ácido caprílico, la ventaja de lograr una molécula de $F(ab)_2$ libre del fragmento Fc y la sencillez al momento de validar procesos, haría que esta combinación de tratamiento enzimático con pepsina y posterior precipitación con ácido caprílico sea el método de elección al momento de realizar la producción industrial de antivenenos para uso humano y veterinario.

Agradecimientos: a la Lic. Lucía Ávila por la realización de los SDS-PAGE y al personal técnico del Servicio Sueros Terapéuticos por su colaboración en el presente trabajo.

Bibliografía citada

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira. 4^o edición, 2005.

Calmette A. Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. Ann Inst Pasteur. 1894; 8:275-291.

Chippaux J.P., Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon. 1998;36(6):823-846.

de Roodt A.R., García S.I., Gómez C.M., Estévez J., Alagón A, Gould E.G., Paniagua-Solis J.F., Dolab J.A., Cursi O.H. Antitoxinas y antivenenos para uso terapéutico. Acta Toxicol Argent. 2009;12(2):29-41.

de Roodt A.R., Litwin S., Estevez J., Gould E.G., Dolab J.A., Gould J. Comparación entre dos métodos de producción para la elaboración de antivenenos ofídicos. Acta Toxicol Argent. 2010;18(1):10-20.

Harlow E., Lane D. Antibodies. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1998.

Harms A.J. The purification of antitoxic plasmas by enzyme treatment and heat denaturation. Biochem J. 1948;42:390-397.

Kolthoff I.M., Sander E.B., Prélat C.E. "Tratado de Química analítica cuántica". 5^o ed. Nigar, 1965.

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.

Ministerio de Saúde. Secretaría de Vigilancia

Sanitaria. Técnicas de fabricação e controle de qualidade dos soros antiofídicos antitóxicos e antirrábico aprobada pela vigilância sanitária. Brasil: Ministerio de Saúde. 1996.

Morais V., Massaldi H. A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: application to plasma purification. Biotechnol Appl Biochem. 2012;59 (1):50-54.

Morais V.M., Massaldi H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. J. Venom. Anim Toxins incl Trop Dis. 2009; 15(1). *On-line version* ISSN 1678 - 9199.

National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 2002.

Nudel B.C., Perdoménico C., Iácono R., Cascone O. Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. Toxicon. 2012;59(1):68-73.

Pope C.G. Dissagregation of proteins by enzymes. Br J Exp Path. 1938;19:245-251.

Pope C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxin and proteins in immune sera: I True digestion of the proteins. Br J Exp Path. 1939a; 20:132-149.

Pope C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxin and proteins in immune sera: II Heat denaturation after partial enzyme action. Br J Exp Path. 1939b;20:201-212.

Rojas G., Jimenez J.M., Gutierrez J.M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a single procedure for antivenom production. Toxicon. 1994;32(3):351-363.

Sjostrom L., Al-Abdulla I., Rawat S., Smith D., Landon J. A comparison of ovine and equine antivenim. Toxicon. 1994;32:427-433.

Steinbuch M., Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. Arch Biochem Biophys. 1969;134(2):279-284.

Theakston R.G.D., Reid H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bulletin of the World.

Theakston R.G.D., Warrell D.A., Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41:541-557.

World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenin. Offset Publication, WHO, Geneva. 1981.

REPORTE DE CASOS

Intoxicación severa por ácido valproico Severe poisoning by valproic acid

Docampo, Patricia C.^{1*}; Parodi, Claudia²; Domínguez, Mónica²; Rodríguez, Estela²; Gallo, Ignacio²; Laguado Nieto, Marlon A.³

¹Centro Nacional de Intoxicaciones – Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Av. Marconi e Illía S/N°, El Palomar. Buenos Aires, Argentina. ²Laboratorio Central. Sector Monitoreo de Drogas – Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Av. Marconi e Illía S/N°, El Palomar. Buenos Aires, Argentina. ³Unidad de Cuidados Intensivos Clínica Norte S.A. Av. 1 18-11 Barrio Blanco, Av. 1 18-11 Barrio Blanco, San José de Cúcuta, Colombia.

*cynthidocampo@hotmail.com

Recibido: 9 de marzo de 2014

Aceptado: 27 de mayo de 2014

Resumen. El ácido valproico es utilizado en el manejo de las crisis de ausencias simples y complejas, mioclonías y convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Es efectivo en las crisis parciales, como profilaxis de segunda línea para la migraña y en el trastorno bipolar. Debido a su amplio uso han aumentado los casos de intoxicación en los últimos años. Los objetivos de este trabajo son describir las manifestaciones clínicas y evolución de una intoxicación severa por ácido valproico, secundaria a ingesta intencional; destacar la importancia del metabolismo de la droga para el manejo clínico de la intoxicación, la necesidad de un laboratorio capaz de proporcionar una rápida cuantificación de la misma y analizar las opciones terapéuticas actuales.

Palabras clave: Ácido valproico; Usos terapéuticos; Intoxicación; Hemodiálisis.

Abstract. Valproic acid is used in crisis management both simple and complex absence, myoclonus and tonic-clonic seizures. It is effective in partial seizures, as second line prophylaxis for migraine and bipolar disorder. Its widespread use has increased cases of poisoning in recent years. The aim of this review is to describe the clinical manifestations and evolution of a severe valproic acid intoxication secondary to intentional consumption as well as emphasize the importance of drug metabolism for clinical management of poisoning, the need for a laboratory provide rapid quantification of this drug and discuss current treatment options.

Key words: Valproic acid; Therapeutic use; Intoxication; Hemodialysis.

Introducción

El ácido valproico (AV), posee una estructura química muy similar a la de los ácidos grasos de cadena corta. Es utilizado en el manejo de las crisis de ausencias simples y complejas, mioclonías y convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Es efectivo en las crisis parciales, como profilaxis de segunda línea para la migraña y en el trastorno bipolar. (Leikin y Paloucek 2001; Gutiérrez 2008. Burns y col. 2010.) Su prescripción en diferentes patologías, hace que este fármaco esté involucrado con frecuencia en distintos tipos de intoxicaciones, algunas de las cuales en ocasiones pueden ser de gravedad. Entre sus propiedades farmacocinéticas se destaca su bajo volumen de distribución y peso molecular, así como su alta unión a pro-

teínas plasmáticas, que desciende con niveles tóxicos de la droga, características que hacen posible su eliminación extracorpórea en casos de intoxicación severa por sobredosis. (Talamoni y col. 2004; Curci 2005; Perrott 2007). Los objetivos de esta presentación son, dar a conocer un caso severo de intoxicación con AV, por ingesta intencional; destacar la importancia del metabolismo de esta droga, para el manejo clínico de la intoxicación; señalar la necesidad de un laboratorio que proporcione una rápida cuantificación de la misma y analizar las opciones terapéuticas actuales.

Caso clínico

Paciente de 27 años de edad, sexo femenino, que ingirió 150 comprimidos de 400 mg (60

gramos) de AV, una hora previa a la consulta. Ingresó por guardia, somnolienta, con signos vitales dentro de parámetros normales. Se indicaron medidas de rescate: lavado gástrico y carbón activado, además de laboratorio completo y dosaje de AV en suero. A las 8 horas de su ingreso, la paciente presentó hipotensión, deterioro progresivo del sensorio y requirió intubación orotraqueal (IOT) y conexión en asistencia respiratoria mecánica (ARM). El electrocardiograma fue normal y recibió carbón activado seriado cada 4 horas. Los resultados de laboratorio mostraron acidosis metabólica, hiperglucemia, movilización de transaminasas y concentración de AV de 1200 µg/ml (metodología FPIA: inmunoensayo de polarización fluorescente) (Tabla 1). La paciente permaneció 3 días en ARM con requerimiento de inotrópicos. El cuadro fue interpretado como intoxicación severa con AV, por lo que se tomó la decisión de realizar hemodiálisis a fin de aumentar la eliminación del fármaco por dicho método extracorpóreo. Luego de dos sesiones de hemodiálisis, se logró obtener niveles aceptables de la droga en suero y entre el tercer y quinto día de internación, se produjo una mejoría clínica de la paciente, siendo su evolución favorable y, si bien presentó pancitopenia, ésta revirtió a los tres meses.

Tabla 1. Determinaciones de laboratorio en el primero, segundo y quinto día de internación.

Parámetro	1° día	2° día	5° día
Glóbulos blancos (/mm ³)	5500		2900
Hto (%)	36,7		26,3
Plaquetas (/mm ³)	173.000		37.000
Glucemia (mg/dl)	174	Normal	
Ionograma			
Na/K/Cl (mmol/l)	149/4,7/110		
pH / bicarbonato	7,28 / 13,7	7,39 / 21	
Urea (mg/dl)	12		
Creatinina (mg/dl)	1,10		
Calcio (mg/dl)	8		
GOT / GPT (UI/l)	62 / 38	89 / 90	
Coagulograma	Normal		
Ác. valproico (µg/ml)	1200	830 (post 1° HD) 94 (post 2° HD)	

Hto: hematocrito, HD: hemodiálisis

Discusión

El ácido valproico, es un compuesto de cadena ramificada de ácido carboxílico (2 ácido propil pentanoico) con una estructura química muy similar a la de los ácidos grasos de cadena corta. Tiene como mecanismo de acción, incrementar los niveles del ácido gamma amino butírico (GABA) y prolongar la recuperación de los canales de sodio inactivados (Leikin y Paloucek 2001; Lheureux y col. 2005; Burns y col. 2010). Estas propiedades serían las responsables de su acción depresora sobre el sistema nervioso central. Altera el metabolismo de los ácidos grasos, la β-oxidación y el ciclo de la urea. Puede ejercer efectos directos sobre membranas excitables y alterar la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica (Seger 1998; Lheureux y col. 2005; Klasco 2010). Se absorbe rápidamente en tracto gastrointestinal, con un pico plasmático a las 4 horas y posee bajo volumen de distribución (0,1 - 0,5 L/Kg) (Lheureux y col. 2005; Burns y col. 2010; Klasco 2010). Luego de una sobredosis de AV, los sitios de unión a proteínas se saturan incrementándose la fracción libre de la droga y su volumen de distribución. Su metabolismo es hepático por conjugación con ácido glucurónico y por oxidación mitocondrial y citoplasmática, en el retículo endoplásmico, con la producción de múltiples metabolitos. (Seger 1998; Lheureux y col. 2005; Burns y col. 2010; Klasco 2010). Muchos de los metabolitos son biológicamente activos y contribuyen a la acción anticonvulsivante, pero también pueden ser responsables de su acción tóxica aún cuando los propios niveles del AV sean normales. (Lheureux y col. 2005; Burns y col. 2010). La vida media de eliminación es de 5 a 20 horas y su rango terapéutico es de 50 - 100 µg/ml de AV (350 a 680 mmol/l), (Leikin y Paloucek 2001; Lheureux y col. 2005; Burns y col. 2010). En rango terapéutico no es raro observar síntomas leves tales como náuseas y vómitos. Con niveles mayores a 450 µg/ml se observan síntomas severos, con depresión del sensorio, que van desde la somnolencia al coma profundo. Cuando se ven superados los 850 µg/ml de AV, al cuadro de coma se le suele agregar inestabilidad hemodinámica y acidosis metabólica (Lheureux y col. 2005; Burns y col. 2010; Klasco 2010), tal se describe en el caso de esta paciente. La mayoría de los pacientes, en general, sólo experimentan letargia leve a moderada, sumándose al cuadro la depresión severa del sistema nervioso central, cuando la dosis ingerida de AV es mayor a 200 mg/kg y

su concentración sanguínea supera los 180 µg/ml, (Seger 1998; Lheureux y col. 2005).

En el caso presentado, la paciente ingresó con un cuadro neurológico leve que permitió realizar las medidas de rescate en una primera instancia, sin embargo, durante el transcurso de su internación evolucionó con hipotensión y deterioro progresivo del sensorio, que requirió de IOT y ARM. Como se describió oportunamente, una vez protegida la vía aérea, se debió continuar, con el suministro de carbón activado seriado, sin mejoría, progresando el deterioro hemodinámico y de los parámetros de laboratorio, determinándose una concentración sérica de AV muy elevada. Esta situación motivó la indicación de medidas extracorpóreas con el objeto de remover la droga circulante y mejorar clínicamente el estado de la paciente ya que es sabido que en casos severos de intoxicación, entre las 12 horas y 4 días posteriores a la sobredosis, puede hacerse clínicamente evidente un cuadro de edema cerebral, siendo factores precipitantes, la elevación del amonio sérico y la disrupción del gradiente osmótico (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Klasco 2010). Finalmente, las complicaciones esperables pueden ser: pancreatitis, alopecia, pancitopenia (leucopenia, trombocitopenia, anemia), entre otras (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Klasco 2010). Se observa hiperamonemia, acidosis metabólica con anión restante aumentado, hiperosmolaridad, hipernatremia e hipocalcemia (Talamoni y col. 2004; Lheureux y col. 2005;

Klasco 2010). Algunos de estos parámetros de laboratorio fueron observados en el caso asistido (Tabla 1). La encefalopatía hiperamonémica inducida por AV, se produce al inhibir la actividad de la enzima carbamoil fosfato sintetasa I, que cataliza la primera reacción en el ciclo de la urea (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Wadzinski 2007). Esto impide la excreción del amoníaco y eleva sus niveles séricos. La hiperamonemia estimula la actividad de la glutamina sintetasa, con incremento en la producción de glutamina en astrocitos y cambio en el gradiente osmótico, ingresando agua al astrocito y provocando edema cerebral (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Wadzinski 2007). Esta situación puede ocurrir tanto en una intoxicación aguda como con el uso regular de AV, siendo más frecuente, cuando se asocia con fenobarbital, fenitoína o carbamazepina (Geoffrey 2003; Perrott 2007; Klasco 2010). Por lo expuesto, los niveles de amonio sérico deben ser monitorizados si hay sospecha clínica de encefalopatía hiperamonémica. El edema cerebral probablemente se deba al metabolismo anormal del AV que permite el aumento de uno de sus metabolitos (2 propil-2 ácido pentenoico) (Figura 1) en el cerebro y en el plasma, con una vida media de eliminación prolongada (43 horas), que podría ser el responsable del estado de coma, situación que suele evidenciarse en algunos pacientes, aún después de haberse normalizado las concentraciones séricas del AV (Lheureux y col. 2005).

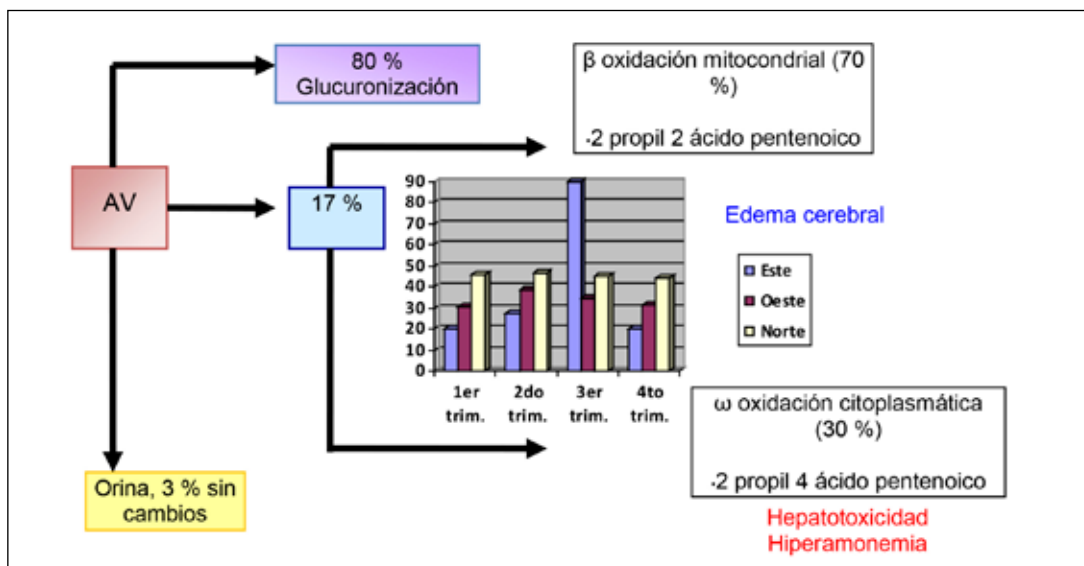


Figura 1. Esquema del metabolismo del ácido valproico (AV). Se observa que en condiciones normales el 80% del AV se conjuga con ácido glucurónico. En sobredosis éste se agota y la vía metabólica se desvía a la β y ω oxidación, dando lugar a metabolitos responsables del edema cerebral, la hepatotoxicidad e hiperamonemia.

La encefalopatía hiperamonémica puede ocurrir algunas veces, sin existir anormalidades en la función hepática, acompañada de confusión, letargia, vómitos, episodios convulsivos, con progresión a estupor y coma. Suele presentarse inmediatamente en la intoxicación aguda o en forma insidiosa en la terapia crónica (Wadzinski 2007). El grado de encefalopatía no está claramente relacionado con los niveles de AV, los cuales pueden estar en rangos de normalidad. El amonio cruza la barrera hemoencefálica, inhibe la captación del glutamato, incrementando su concentración en cerebro con activación de receptores NMDA y convulsiones (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Klasco 2010). Se puede observar supresión de la médula ósea, 3 a 5 días posteriores a una intoxicación aguda masiva con AV, caracterizada por una pancitopenia que usualmente resuelve espontáneamente a los pocos días (Perrott 2001; 2007). En el caso que se presenta en esta oportunidad, se observó compromiso de las tres series al quinto día de internación, cuadro que revirtió paulatinamente en el lapso de tres meses.

El tratamiento de esta intoxicación consiste en aplicar precozmente las medias de soporte vital, protegiendo la vía aérea y buscando la estabilidad hemodinámica. En los pacientes que se presentan tempranamente a la consulta, es de rigor utilizar la descontaminación gástrica y la administración de dosis única de carbón activado, además de corregir las anormalidades electrolíticas o trastornos del estado ácido-base (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Klasco 2010).

Debido a que la hiperamonemia y la hepatotoxicidad pueden ser mediadas, al menos en parte, por la deficiencia de carnitina, se piensa que el aporte de L carnitina podría prevenir, corregir o atenuar estos efectos adversos. Por lo que estaría indicada en los casos de evidencia de hiperamonemia y/o hepatotoxicidad (Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Klasco 2010) con una dosis de carga de 100 mg/kg, I.V. a pasar en 30 minutos, (máximo 6 g de carnitina) (Seger 1998; Lheureux y col. 2005; Perrott 2007; Klasco 2010). Mientras que una dosis de mantenimiento de 15 mg/kg de carnitina a pasar entre 10 a 30 minutos, cada 4 horas, sería lo aconsejable hasta que se compruebe descenso en los niveles de amonio sérico y se perciba una respuesta neurológica favorable (Seger 1998; Perrott 2007; Klasco 2010; Perrott 2010). A la hora de al interpretar los niveles de amonio sé-

rico hay que tener precaución, puesto que los mismos no se correlacionan linealmente con la clínica del enfermo, pero sí son de gran utilidad para evaluar el estado metabólico del paciente (Lheureux 2005; Perrott 2010).

Sin lugar a dudas, la hemodiálisis es un procedimiento efectivo para remover sustancias de la circulación, aumentando aproximadamente 10 veces la eliminación de éstas con relación a la diuresis forzada. Por lo que es de gran utilidad cuando los niveles del tóxico en sangre son muy elevados. (Peces y col. 2007; Gutiérrez 2009). En el caso expuesto, a pesar de haberse aplicado en tiempo las medidas de rescate, la paciente evolucionó con deterioro progresivo del sensorio, inestabilidad hemodinámica, acidosis metabólica, hipernatremia hiperglucemia y niveles muy elevados de AV en suero (1200 µg/ml), situación que motivó la aplicación de medidas extracorpóreas, como lo sugiere la bibliografía oportunamente citada.

Las medidas extracorpóreas (hemodiálisis o hemofiltración), están indicadas en casos de disfunción renal, hipotensión refractaria, anormalidades metabólicas severas y actividad epiléptica o coma persistente (Peces y col. 2007; Gutiérrez 2009). La hemodiálisis sería más efectiva que la hemoperfusión, aunque esto puede ser limitado por el colapso circulatorio (Geoffrey 2003; Peces y col. 2007). No debe utilizarse en aquellos casos que presenten concentraciones plasmáticas menores a los 850 µg/ml, debido a que todos los pacientes con dicho nivel de concentración, se han recuperado con medidas de soporte, de acuerdo a la bibliografía consultada (Geoffrey 2003; Peces y col. 2007). Por lo tanto, la hemodiálisis o la hemoperfusión, estarían indicadas sólo para casos de intoxicación severa que no responden al tratamiento de soporte usual o a otras medidas menos invasivas (Peces y col. 2007).

El bajo peso molecular y el bajo volumen de distribución del AV, podrían sugerir un potencial beneficio para la terapia extracorpórea, pero su alta unión a proteínas interfiere con la eficacia de esta práctica, resultando en un bajo impacto en la eliminación del AV a dosis plasmáticas usuales, dada la limitada cantidad de droga disponible para difundir a través de la membrana (Peces y col. 2007). La tasa de depuración por medio de este método es de aproximadamente 50-90 ml/min (Peces y col. 2007).

Cuando las concentraciones plasmáticas de la droga son elevadas, la capacidad de unión a proteínas, se ve saturada (niveles de 90 a 100

µg/ml), aumentando la cantidad de droga libre en el plasma, la que sí puede cruzar la membrana dialítica (Peces y col. 2007; Gutiérrez 2009) por lo que en la literatura está descrito el uso de la hemodiálisis y/o la hemoperfusión en el tratamiento de la sobredosis por AV, sobre todo en pacientes intoxicados con hipotensión refractaria o convulsiones.

Conclusión

En los últimos años el aumento en la prescripción de AV a consecuencia de su amplio uso terapéutico, determinó un significativo incremento de los casos de intoxicación atendidos. Afortunadamente, la mayoría de los casos suelen ser leves, requiriendo sólo tratamiento de sostén, sin embargo, cuando la ingesta supera los 200 mg/kg, como el caso presentado, se debe pensar en un compromiso grave del paciente, que obliga a actuar en consecuencia, en donde, además de instaurarse las medidas de rescate habituales, debe tenerse presente la implementación de prácticas extracorpóreas. Cuando las concentraciones séricas de AV superan los 850 µg/ml y el estado del paciente es grave, la indicación es la hemodiálisis. Éste es un procedimiento útil dadas las características cinéticas que presenta esta droga cuando sus valores plasmáticos son elevados. Esta situación marca la importancia de poder disponer de un laboratorio que proporcione una rápida cuantificación del fármaco en plasma, dosimetría necesaria e indispensable para decidir el mejor tratamiento.

Bibliografía citada

Burns M., Palmer B, Traub S, Grayzel J. Valproic acid poisoning. [en línea]. UpToDate Versión 18.2. UpToDate Inc. Wellesley, USA, 2010. [consulta: enero de 2014]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/es/home>.

Curci O. Anticonvulsivantes. Acido valproico. En: Curci O. Toxicología. 3ª Ed. Buenos Aires: La Prensa Médica, Argentina; 2005. p. 287-290.

Gutiérrez M. Anticonvulsivantes. En: Guías para el manejo de urgencias toxicológicas. Ministerio de Protección Social de la República de Colombia; 2008. p. 123-127.

Gutiérrez M. Manejo del paciente intoxicado. Guías para el manejo de urgencias. Ministerio de Protección Social de la República de Colombia. Tercera Edición. Tomo III. 2009;(21):201-214.

Isbister G.K., Balit C.R., Whyte I.M. and Dawson A. Valproate overdose: a comparative cohort study of self poisonings. Blackwell Publishing Ltd - Br J Clin Pharmacol. 2003;55(4):398-404.

Klasco R.K. (Ed): POISINDEX® System. Thomson Reuters, Micromedex. Greenwood Village: Thomson Reuters, 2010.

Leikin J.B., Paloucek F.P. Poisoning and toxicology compendium. Ohio: Lexi-Comp Inc, 2001. Lheureux P.E.R., Penaloza A., Zahir S., Gris M. Science review: Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity –what is the evidence? Critical Care. 2005;9(5):431-440.

Peces R., Fernández E.J., Sánchez R.J., Peces C., Montero A., Selgas R. Tratamiento con hemoperfusión de la intoxicación aguda por ácido valproico. Nefrología. 2007;27(3):370-373.

Perrott J. Anticonvulsants. Valproic acid. En: Hoffman R, Nelson L, Howland M, Goldfrank L, Flomenbaum M. y Lewin N. Goldfrank's Manual of toxicologic emergencies. Nueva York: Mc Graw Hill, 2007. p. 406-408.

Perrott J. L-Carnitine. En: Hoffman R., Nelson L., Howland M., Goldfrank L., et al. Manual of toxicologic emergencies. Nueva York: Mc Graw Hill, 2007. p. 411-413.

Perrott J., Murphy N.G., Zed P.J. Toxicology. L-Carnitine for acute valproic acid overdose: a systematic review of published cases. The Annals of Pharmacotherapy. 2010;44:1287-93.

Seeger D.L. Anticonvulsants. En: Haddad L., Shannon M., Winchester J.F. Clinical management of poisoning and drug overdose. 3rd Ed. Filadelfia: W. B. Saunders Company, 1998. p. 655-663.

Talamoni M., Crapanzano G., López Sarmiento C. Anticonvulsivantes. Ácido valproico. En: Talamoni M., Crapanzano G., López Sarmiento C. Guía de diagnóstico y tratamiento en Toxicología. Buenos Aires: EUDEBA, 2004. p. 133-134.

Wadzinski J., Franks R., Roane D. and Bayard M. Valproate-associated Hyperammonemic Encephalopathy. J Am. Board Fam Med. 2007;20:499-502.

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, imágenes, 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.

Las imágenes en Toxicología pueden corresponder a imágenes relacionadas con la toxicología, desde lo artístico a los aspectos biológicos: plantas tóxicas, hongos tóxicos, animales venenosos, animales ponzoñosos, floraciones algales, químicos, alteraciones ambientales, casos clínicos, diagnóstico por imágenes (radiografía, electrocardiogramas, ecografías, angiografía, tomografía, resonancia magnética, microscopía óptica o electrónica, etc.).

El objetivo de la Sección Imágenes en Toxicología es la publicación de imágenes originales (1-2 figuras de alta calidad) o clásicas intere-

santes o hallazgos inusuales que faciliten el diagnóstico clínico, de laboratorio o eco-epidemiológico de causas con origen toxicológico.

Las imágenes pueden no ser excepcionales, pero sí ilustrativas.

El título debe ser corto y descriptivo. Si la imagen es una imagen clínica, el texto debería ser una descripción de la presentación del paciente seguida por puntos relevantes explicativos y el diagnóstico final. Las imágenes deberían incluir una leyenda descriptiva. Si la imagen corresponde a otros puntos de la toxicología, se debe incluir una breve descripción del contexto de la misma en el texto.

Por favor, utilice flechas o signos para identificar los puntos de interés en la imagen. En los casos clínicos remueva cualquier información de identificación del paciente.

El máximo de palabras recomendado es: resumen 200, texto 1000 y no más de 12 referencias.

Se aceptará un máximo de 3 autores por imagen.

En caso que la imagen no sea original, debe acompañarse de la autorización del propietario o de quien posea los derechos de la misma, lo que debe estar indicado en la nota que se presente al Comité Editorial de *Acta Toxicológica Argentina*.

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 cambios 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.

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, 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 con una calidad suficiente (mínimo 300 dpi) para asegurar una buena reproducción. Se aceptarán fotografías en 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, images, 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.

Images in Toxicology may be images related with Toxicology from the artistic to the biological and medical aspects: toxic plants, toxic fungi, venomous animals, poisonous animals, algal bloom, chemicals, environmental ecotoxicological alterations, clinic cases, diagnostic images (radiograph, electrocardiogram, echography, angiography, tomography, magnetic resonance Image, optic or electron microscopy, etc).

The objective of the Section of Images in Toxicology is the publication of original images (1-2 high quality figures) of classic, interesting or unusual findings that facilitate the clinical, laboratorial or eco-epidemiological diagnosis of toxicological origin.

Such images should be not necessarily excep-

tional, but illustrative.

The title should be short and descriptive. If the image is a clinic image, text should be a description of the patient presentation, followed by relevant explicative points and the final diagnosis. Images should include a descriptive legend. If the image is of other fields of the toxicology, a brief description of the context should be included in the text.

Please use labels and arrows to identify points of interest on the image. In clinical cases remove any identifying patient information.

Maximum word guidance: abstract 100 words, text 1000 words. The number of references should not be over 12.

No more than three authors may be listed.

If the image is not original, the authorization of the author or whom poses the copyright must be added in the presentation letter to be presented to the Editorial Committee of *Acta Toxicológica Argentina*.

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

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

Submission of manuscripts

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>

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, 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 superscript 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.

Photographs should have proper quality and a minimum resolution of 300 dpi. JPEG and GIF are accepted file formats for photographs and figures. 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
Aboud 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 da tese, imagens, 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.

Imagens em Toxicologia podem corresponder a imagens relacionadas com a toxicologia, desde o artístico aos aspectos biológicos: plantas tóxicas, fungos tóxicos, animais venenosos, animais peçonhentos, florações de algas, químicos, alterações ambientais, casos clínicos, diagnóstico por imagens (radiografia, eletrocardiogramas, ecografias, angiografia, tomografia, ressonância magnética, microscopia óptica ou eletrônica, etc.).

O objetivo da Sessão Imagens em Toxicologia é a publicação de imagens originais (1-2 figuras de alta qualidade) ou clássicas interessantes

ou achados pouco usuais que facilitem o diagnóstico clínico, laboratorial ou eco epidemiológico de causas com origem toxicológica.

As imagens não devem ser excepcionais, mas sim ilustrativas.

O título deve ser curto e descritivo. Se a imagem é uma imagem clínica, o texto deveria ser uma descrição da apresentação do paciente seguida por pontos relevantes explicativos e o diagnóstico final. As imagens deveriam incluir uma legenda descritiva. Se a imagem corresponde a outros pontos de toxicologia, se deve incluir uma breve descrição do contexto da mesma no texto.

Por favor, utilize flechas ou símbolos para identificar os pontos de interesse na imagem. Nos casos clínicos remova qualquer informação de identificação do paciente.

O máximo de palavras recomendado é: Resumo 200, Texto 1000 e não mais de 12 referências.

Não deve haver mais de três (3) autores.

No caso que a imagem não seja original, deve ser acompanhada de autorização do proprietário ou de quem possua os direitos da mesma, o que deve estar indicado na nota que apresentada ao Comitê Editorial da *Acta Toxicológica Argentina*.

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

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

Envio de trabalhos

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.

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 responder.

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho, 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 superíndices 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 com qualidade suficiente (mínimo 300 dpi) para assegurar uma boa reprodução. 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 Referências, 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.