

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 23
N° 1
Mayo 2015

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

Mirtha Nassetta, ISEA, Univ. Nac. de Córdoba

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 Río Grande, Brasil

Irma R. Pérez, Universidad Autónoma de México, México

Haydée N. Pizarro, CONICET, Argentina

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

María M. Salseduc, Laboratorios Bagó, Argentina

Carlos Sèvcik, IVIC, Venezuela

Francisco O. de Siqueira França, Instituto Butantan, Brasil

Norma Vallejo, SEDRONAR, Argentina

Edda C. Villaamil Lepori, Universidad de Buenos Aires, Argentina

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

INDICE (CONTENTS)

Artículos

Evaluación de la ingesta diaria de cafeína en niños y adolescentes de Argentina <i>Bardoni, Natalia; Contartese, Cecilia M.; Olmos, Valentina</i>	5
Metallothionein and lipid peroxidation as markers to assess health status of chronically oiled Magellanic penguins in Argentina <i>Romero, María Belén; Polizzi, Paula; Chiodi, Leila; Robles, Alicia; Rodríguez Heredia, Sergio; Gerpe, Marcela</i>	15
Biomarcadores hematológicos del sapo común <i>Bufo arenarum</i> en ecosistemas alterados de la provincia de Córdoba <i>Salinas, Zulma Anahí; Salas, Nancy Edith; Baraquet, Mariana; Martino, Adolfo Ludovico</i>	25
Revisiones	
Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico <i>Rodrigues da Silva, Lais; Martins, Livia do Vale; Bantim Felicio Calou, Iana; Meireles de Deus, Maria do Socorro; Pinheiro Ferreira, Paulo Miche; Peron, Ana Paula</i>	36
Intoxicaciones con rodenticidas superwarfarínicos <i>Gallardo Ferrada, Amanda Isabel; Lizana Gajardo, Felipe; Gutiérrez Torres, Waldo</i>	44
Reportes de casos	
Ayahuasca, qualidade de vida e a esperança de adictos em recuperação: relatos de caso <i>Dias de Jesus Júnior, Tenes; de Oliveira Salvi, Jeferson; Ramos Evangelista, Dilson Henrique</i>	53
Instrucciones para los autores	63

Los resúmenes de los artículos publicados en Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en la base de datos LILACS, en la dirección literatura científica del sitio www.bireme.br

Acta Toxicológica Argentina está indexada en el Chemical Abstracts. La abreviatura establecida por dicha publicación para esta revista es Acta Toxicol. Argent.

Calificada como Publicación Científica Nivel 1 por el Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT), en el marco del Proyecto Latindex

ARTÍCULOS

Evaluación de la ingesta diaria de cafeína en niños y adolescentes de Argentina Assessment of caffeine daily intake in children and adolescents from Argentina

Bardoni, Natalia*; Contartese, Cecilia Mariel; Olmos, Valentina

Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956, 7mo piso, C1113AAD, CABA. Tel/
Fax: 4964-8283/4

*nbardoni@ffyb.uba.ar

Recibido: 16 de enero de 2014

Aceptado: 14 de diciembre de 2014

Resumen. La cafeína (1,3,7 trimetilxantina) es un alcaloide de la familia de las xantinas. Está presente en una gran cantidad de bebidas como café, té, cacao, mate, guaraná, bebidas gaseosas y bebidas energizantes, y alimentos que son consumidos por adultos, adolescentes y niños. A fin de obtener información acerca de la ingesta de cafeína en población infantil y adolescente de Argentina, se plantearon los siguientes objetivos de trabajo: a) estimar la ingesta diaria de cafeína en niños y adolescentes que residen en conglomerados urbanos de Argentina; b) estudiar la asociación de dicha ingesta con distintas variables tales como el género, la edad, el nivel socioeconómico (NSE) y el lugar de residencia; c) estudiar la relación de la ingesta de cafeína con la duración del sueño y d) valorar la contribución de las distintas bebidas a la ingesta diaria de cafeína. Se obtuvieron los datos de consumo de bebidas de 425 participantes de hasta 20 años de edad, residentes de distintas ciudades del país y de diferente NSE. Los resultados mostraron que la ingesta diaria promedio de cafeína (11, 43, 76, 132 y 233 mg/día) aumentó con la franja etaria (menores de 2, de 3 a 5, de 6 a 12, de 13 a 17 y de 18 a 20 años, respectivamente), aunque al relacionarla con el peso corporal (mg/kg/día) el aumento no fue tan marcado. El 50 % de los niños de hasta 2 años evaluados, nunca había consumido bebidas con cafeína. Por el contrario, a partir de 3 años en adelante más del 90 % sí consumieron regularmente por lo menos una bebida con cafeína. Las ingestas promedio calculadas para los niños y adolescentes evaluados resultaron ser superiores a las reportadas por otros autores para otros países. No se encontraron diferencias en la ingesta según el género, el lugar de residencia o el NSE. No se encontró relación entre la ingesta de cafeína y la duración del sueño para ningún grupo etario, a excepción de la franja etaria de 18 a 20 años en la que se observó una disminución significativa en la duración promedio del sueño para el grupo de individuos con ingesta extrema. Las bebidas gaseosas cola se mostraron como principales contribuyentes a la ingesta promedio de cafeína, aunque el mate también se destacó en ese aspecto. Como conclusiones generales de este trabajo se destaca que se logró caracterizar la ingesta de cafeína en niños y adolescentes y establecer la composición de dicha ingesta en cuanto a sus contribuyentes mayoritarios y minoritarios. Por último, si bien se podría clasificar a las ingestas promedio obtenidas en este estudio como elevadas con respecto a las reportadas para otros países, se debe considerar que no se ha definido un valor de ingesta diaria recomendada para niños y adolescentes.

Palabras clave: Cafeína; Niños; Adolescentes; Ingesta

Abstract. Caffeine (1,3,7 trimethylxanthine) is a naturally occurring alkaloid. It is present in many beverages such as coffee, tea, cocoa, mate, guarana, soft drinks and energy drinks, and foods, widely consumed by adults, adolescents and children. Since information about caffeine intake in children and adolescents in our country is scarce, the aims of the study were set as follows: a) estimate the caffeine daily intake of children and adolescents from Argentina, b) associate the intake to different variables such as gender, age, socioeconomic status (SES) and place of residence; c) study the relationship between caffeine intake and sleep duration, and d) assess the contribution of different beverages to the caffeine daily intake. Information on non alcoholic beverages consumption was obtained from 425 participants up to 20 years old. Participants were from different cities and of different SES all over the country. Results showed that the caffeine mean daily intake increased (11, 43, 76, 132 and 233 mg/day) with age range (up to 2, 3 to 5, 6 to 12, 13 to 17 and 18 to 20 years old, respectively), but when the intake was related to body weight (mg/kg/day) the increase was not so marked. Fifty percent of children up to 2 years old had never consumed any caffeinated beverage. However, from ages 3 and up, more than 90% of children regularly consumed at least one caffeinated beverage. The mean daily intakes for the evaluated children and adolescents were higher to those reported by other authors for other countries. When data were analyzed by gender, place of residence or SES, no differences in caffeine intake were observed. No relationship between caffeine intake and sleep duration for any age group was found, except for the age group of 18-20 years, where a significant

decrease in average sleep duration for the group of individuals with extreme intake was observed. Soft drinks showed to be main contributors to the mean caffeine daily intake, although *mate* also highlighted in that aspect.

Characterization of the caffeine daily intake and identification of the major and minor contributors to that intake are remarked as achievements of this study. And finally, although caffeine mean daily intake obtained in this study could be considered as elevated when compared with those reported for other countries, it should be noted that a recommended daily intake value for children and adolescents has not already been set.

Keywords: Caffeine; Children; Adolescents; Intake

Introducción

La cafeína (1,3,7 trimetilxantina) es un alcaloide de la familia de las xantinas. Está presente naturalmente en una gran cantidad de plantas tales como *Coffea arabica*, *Coffea robusta*, *Thea sinensis*, *Theobroma cacao*, *Cola acuminata*, *Ilex paraguayensis* y *Paullinia cupana*. Estas plantas se emplean en la preparación de bebidas como café, té, cacao, mate, guaraná, bebidas gaseosas y bebidas energizantes; y alimentos como caramelos, chocolates y helados. Todas estas bebidas y alimentos son ampliamente consumidos por adultos, adolescentes y niños.

La cafeína es una sustancia psicoactiva, estimulante del sistema nervioso central (Berkowitz y col. 1970; Nehlig y col. 1992; Smith 2002). Además, afecta el sistema cardiovascular (Pincomb y col. 1985; Pincomb y col. 1993; Savoca y col. 2005; Farag y col. 2005; Usman y Jawaid 2012), tiene efecto diurético (Warzak 2011) y es inhibidora de la contractilidad del músculo liso (Ahn y col. 1988; Echeverri y col. 2010).

En adultos sanos, una ingesta de 200 mg/día (equivalente a menos de 2 tazas de café o a 12 mates) está asociada a efectos considerados benéficos o positivos sobre el estado de ánimo como mejorar el estado de alerta, la eficiencia, la energía, la concentración y la motivación para trabajar (Ellenhorn 1997; Fredholm y col. 1999; Heckman 2010) y una ingesta moderada de cafeína (400 mg/día) no se ha asociado a efectos adversos o tóxicos (Nawrot y col. 2003).

Las bebidas gaseosas son, en muchos países, los alimentos que más contribuyen a la ingesta de cafeína en la población infantil y adolescente (Ellison 1995; Skinner 2000; Vallek 2004; Pardo Lozano 2007). En la actualidad, en esta población, no se ha establecido una ingesta asociada a efectos positivos o benéficos. En cambio, sí se han descrito efectos no deseados como disturbios en el sueño (Pollak y Bright 2003).

La información acerca de la magnitud y la composición de la ingesta de cafeína en población infantil y adolescente de Argentina es incierta o no está disponible para su evaluación y consulta, brecha que este trabajo se propone cerrar cubriendo los siguientes objetivos: a) estimar la ingesta diaria de cafeína en niños y adolescentes; b) estudiar la asociación de dicha ingesta con distintas variables tales como el género, la edad, el nivel socioeconómico (NSE) y el lugar de residencia; c) estudiar la relación de la ingesta de cafeína con la duración del sueño y d) valorar la contribución de las distintas bebidas a la ingesta diaria de cafeína.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de tipo transversal durante los años 2010 y 2011, de recolección de datos, para establecer la ingesta diaria de cafeína en población infantil y adolescente de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y localidades aledañas, y de algunas ciudades del interior del país.

Se incluyeron en el estudio niños y adolescentes de ambos sexos y de hasta 20 años de edad. En el caso de participantes menores de 18 años las encuestas fueron completadas por los padres.

Una vez realizadas y evaluadas las encuestas, se excluyeron del estudio todas aquellas que no habían sido completadas en forma correcta sobre consumo de bebidas que contienen cafeína y/o aquellas en las que no se completaron los datos de edad y/o peso de los participantes.

Para el análisis de resultados, los participantes fueron agrupados por edad de acuerdo a los distintos niveles de escolaridad vigentes en Argentina. Los rangos de edad seleccionados fueron: jardín maternal, hasta 2 años; jardín de infantes, 3 a 5 años; escuela primaria, 6 a 12 años; escuela secundaria, 13 a 17 años y estudios superiores y otros, 18 a 20 años.

Estudio de la ingesta diaria de cafeína

Se investigó la ingesta de cafeína a través del consumo de bebidas en población infantil y adolescente. Los participantes debieron completar una encuesta semi-cerrada sobre el consumo semanal (en porciones) de bebidas que contienen cafeína (café, té, mate, bebidas cola, bebidas energizantes, entre otras), además de otros datos de interés como edad, horas de sueño y peso.

Se obtuvo, para cada participante, el consumo semanal de cada bebida en unidad de volumen y luego se estimó el consumo diario dividiendo el consumo semanal por siete.

La ingesta diaria de cafeína (en mg) se calculó multiplicando el consumo diario (en ml) de cada bebida por el contenido medio de cafeína de cada bebida (mg/ml) obtenido en un estudio previo (Olmos y col. 2009), y sumando los aportes de todas las bebidas. Esta ingesta se expresó en mg/día y en mg/kg/día.

Para la evaluación de los resultados se consideraron para cada grupo etario dos niveles de ingesta: la ingesta promedio y la ingesta elevada o extrema (comprendida entre los percentiles 95 a 100).

Estudio de las características socio-económicas y culturales

La encuesta también incluyó datos sobre la zona de residencia, el nivel de educación, las actividades recreativas extra-escolares, la actividad laboral (para mayores de 16 años). Para establecer el nivel socio-económico (NSE) de los participantes se utilizó una clasificación de la Cámara de Control de Medición de Audiencias que cruza las variables educación y ocupación de los padres (CCMA 2007).

Las categorías o niveles socio-económicos considerados fueron tres: alto, medio y bajo.

Duración del sueño

Mediante la encuesta se obtuvo información sobre las horas de sueño de los niños y adolescentes. La duración del sueño se incluyó como marcador de efecto.

Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con InfoStat versión 2011. La variable ingesta de cafeína no se ajustó a una distribución normal por lo cual se utilizaron pruebas no paramétricas. Para la comparación de ingestas medias de dos poblaciones, se utilizó la prueba de Mann Whitney (Gómez-Gómez y col. 2003). Para la comparación de ingestas medias entre más de dos poblaciones se utilizó la prueba de análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis (Gómez-Gómez y col. 2003).

Resultados

Se recibieron 464 encuestas, de las cuales 39 fueron desestimadas por falta de algún ítem de requerimiento obligatorio (peso, edad, género) y/o por ingreso erróneo de datos de ingesta. Se procesaron, entonces, los datos correspondientes a 425 participantes. De éstos, 218 (51 %) fueron varones y 207 (49 %) fueron mujeres. En cuanto al lugar de residencia 136 (33 %) fueron de Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), 208 (49 %) de Provincia de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense (PBA), 74 (17 %) del interior del país (INT) y 7 (2 %) fueron sin datos. De acuerdo al NSE se agruparon como sigue: 184 (43 %) de NSE alto, 191 (45 %) de NSE medio, 49 (12 %) de NSE bajo y 1 sin dato.

Tabla 1. Ingestas promedio y extrema (percentil 95) de cafeína (en mg/kg/día y mg/día) por grupo etario.

Grupo etario	N	ingesta de cafeína				% de la población con ingesta
		mg/kg/día		mg/día		
		promedio	percentil 95	promedio	percentil 95	
hasta 2 años	31	0,8 ^a	3,0	11 ^A	44	51,6
3 a 5 años	40	2,3 ^{b,c}	5,2	43 ^B	100	7,5
6 a 12 años	145	2,4 ^b	6,7	76 ^C	174	2,1
13 a 17 años	117	2,3 ^b	5,7	132 ^D	331	6,8
18 a 20 años	92	3,8 ^c	10,2	233 ^E	601	9,8

Nota: letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas (P<0,05)

De acuerdo a las categorías de edad, los participantes se distribuyeron según se muestra en la *Tabla 1*.

En todos los grupos etarios más del 90 % de los niños y adolescentes consumieron alguna bebida con cafeína, con excepción del grupo de hasta 2 años en el cual más del 50 % de los niños no registró ningún consumo (ingesta 0 mg) (*Tabla 1*).

Se observó un claro incremento en la ingesta diaria promedio de cafeína (mg/día) con la edad. Sin embargo, cuando la ingesta promedio se calculó por kg de peso corporal, el incremento con la edad no fue tan marcado. Las diferencias entre ingestas diarias promedio expresadas en mg/kg de peso corporal no fueron significativas ($P > 0,05$) entre los grupos 3 a 5 años, 6 a 12 años y 13 a 17 años. Se diferenciaron significativamente entre sí, y de los otros grupos, las ingestas de los grupos de hasta 2 años y de 18 a 20 años (*Tabla 1*). Las ingestas promedio y extrema (en mg/kg/día y en mg/día) para cada grupo etario se muestran en la *Tabla 1*. Se observó que los valores extremos (percentil 95) duplicaron, triplicaron y, en algunos casos, hasta cuadruplicaron las ingestas promedio.

Asociación entre la ingesta diaria de cafeína y el género

En cuanto a la comparación entre mujeres y varones, no se observó diferencia significativa entre las ingestas de cafeína (en mg/kg/día) para ningún grupo etario, aunque en todos los casos las ingestas de las mujeres fueron más elevadas que las de los varones (*Tabla 2*).

Bebidas contribuyentes a la ingesta diaria de cafeína

Las bebidas que más aportaron a la ingesta promedio para cada franja etaria fueron las

Tabla 2. Ingestas promedio de cafeína (en mg/kg/día y mg/día) por grupo etario según el género.

Grupo etario	Ingesta promedio		P
	mg/kg/día mujeres	mg/kg/día varones	
hasta 2 años	1,2	0,4	0,1852
3 a 5 años	2,6	2,6	0,5026
6 a 12 años	2,5	2,2	0,2643
13 a 17 años	2,6	2,1	0,0973
18 a 20 años	4,5	2,9	0,0629

Tabla 3. Composición porcentual de la ingesta promedio y de la ingesta de los percentiles 95 a 100.

edad años	ingesta promedio mg/kg/día	gaseosas cola ^a		bebidas energizantes		té %	café ^b %	mate ^c %	leche chocolatada %		percentiles 95 a 100 mg/kg/día	gaseosas cola ^a %		bebidas energizantes %		té %	café ^b %	mate ^c %	leche chocolatada %	
		%		%					%			%		%					%	
hasta 2	0,8	22	0	3	0	4	0	0	19	3,0	0	0	0	0	18	0	0	0	82	
3 a 5	2,3	38	0	14	1	14	1	14	26	5,2	5	0	0	13	10	63	8	8		
6 a 12	2,4	30	1	16	12	20	18	18	18	6,7	32	0	0	11	13	42	1	1		
13 a 17	2,3	31	2	15	20	18	8	18	8	5,7	11	2	2	17	24	45	0	0		
18 a 20	3,8	18	3	9	28	28	5	28	5	10,2	9	0	0	9	37	44	44	0		

^a regulares y dietéticas

^b incluye café, café con leche, capuccino, café expreso

^c incluye mate cocido y mate cebado

gaseosas cola y la leche chocolatada (Tabla 3), aunque, en los grupos de mayor edad, se observó un aumento en el aporte del mate y el café. En las ingestas extremas (percentiles 95 a 100) el mate se mostró como el principal contribuyente en todas las franjas etarias, con porcentajes mayores al 40 %, a excepción de la franja etaria de hasta 2 años, en la cual predominó el aporte de la leche chocolatada (Tabla 3).

Asociación entre la ingesta diaria de cafeína y el NSE

En la Tabla 4 se muestran las ingestas promedio de cafeína para cada franja etaria según el NSE. Se observó que, si bien las ingestas son similares, pareciera haber una tendencia a ingestas mayores de cafeína en el NSE más bajo.

Asociación entre la ingesta diaria de cafeína y el lugar de residencia

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,1$) al comparar las ingestas promedio según el lugar de residencia, CABA: 2,7

mg/kg/día, PBA: 2,5 mg/kg/día e INT: 2,8 mg/kg/día. El principal contribuyente a la ingesta de cafeína en CABA y PBA fue el mate con valores mayores al 40 % y en el interior del país los principales contribuyentes, fueron el mate y las bebidas cola con aportes similares cercanos al 30 % (Figura 1).

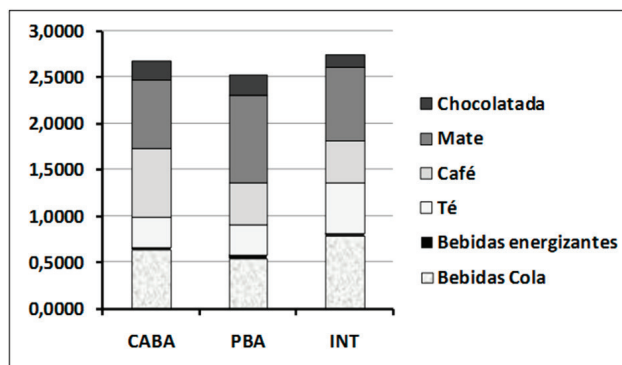


Figura 1. Composición de la ingesta promedio de cafeína, expresada en mg/kg/día, según el lugar de residencia.

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, PBA: Provincia de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense, INT: Interior del país

Tabla 4. Ingesta promedio de cafeína (mg/kg/día) según nivel socio-económico (NSE); alto (A), medio (M) y bajo (B); respecto de los distintos grupos etarios.

	NSE		
	A (N)	M (N)	B (N)
Hasta 2 años	0,7 ^a (24)	1,1 ^a (6)	2,8* (1)
3 a 5 años	2,8 ^a (20)	2,1 ^a (18)	4,2* (3)
6 a 12 años	2,0 ^a (48)	2,3 ^a (69)	3,2 ^b (28)
13 a 17 años	2,1 ^a (53)	2,4 ^{a,b} (54)	3,5 ^b (8)
18 a 20 años	3,9 ^a (42)	3,7 ^a (41)	3,7 ^a (8)

Composición de la ingesta según el NSE

	A	M	B
Hasta 2 años	gaseosas y chocolatada	gaseosas y chocolatada	gaseosas
3 a 5 años	gaseosas y chocolatada	gaseosas y chocolatada	gaseosas
6 a 12 años	gaseosas y mate	gaseosas y mate	mate y té
13 a 17 años	gaseosas y café	gaseosas y café	mate
18 a 20 años	café y mate	café y mate	gaseosas y mate

Nota: las comparaciones se realizaron dentro de cada franja etaria. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). N: número de participantes.

*el número de participantes no permitió realizar la comparación.

Relación entre la ingesta diaria de cafeína y las horas de sueño

No se encontró relación entre la ingesta de cafeína y las horas de sueño para los distintos grupos etarios, aunque en la franja de 18 a 20 años, se observó una disminución significativa en las horas de sueño para el grupo con ingestas mayores a 10,2 mg/kg/día (percentiles 95 a 100) (Tabla 5).

Tabla 5. Ingesta promedio de cafeína y duración promedio del sueño según la franja etaria para dos niveles de ingesta.

Franja etaria	Hasta percentil 94		Percentiles 95 a 100	
	Duración promedio del sueño (h)	Ingesta promedio de cafeína (mg/kg/día)	Duración promedio del sueño (h)	Ingesta promedio de cafeína (mg/kg/día)
Hasta 2	10,7 ^a	0,8	9,5 ^a	3,0
3 a 5	9,6 ^a	2,3	9,8 ^a	5,2
6 a 12	9,0 ^a	2,4	8,5 ^a	6,7
13 a 17	8,2 ^a	2,3	7,4 ^a	5,7
18 a 20	7,6 ^a	3,8	6,9 ^b	10,2

Nota: las comparaciones se realizaron dentro de cada franja etaria. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Discusión

El consumo, en niños y adolescentes, de bebidas que contienen cafeína está muy difundido en todas las culturas y regiones (Arbeit y col. 1988; Camargo y col. 1999; Ahuja y Perloff 2001; Bello y Al Hammad 2006; Higdon y Frei 2006; Meltzer y col. 2008, Olmos y col. 2009, Temple 2009; Feferbaum y col. 2012). La ingesta de cafeína en los niños es muy variable y va a depender del perfil de consumo de las distintas bebidas que la contienen.

Son numerosos los estudios que relacionan al consumo de cafeína con distintos problemas de salud en niños y adolescentes, como alteraciones en el comportamiento (Castellanos y Rapoport 2002; Temple 2009; Temple y col. 2009), alteraciones cardiovasculares (Turley y col. 2008; Temple y col. 2010), alteraciones del sueño (Calamaro y col. 2012), sin embargo, son escasos los trabajos que proporcionan información cuantitativa acerca de la ingesta de cafeína en estos grupos etarios (Olmos y col. 2009; Temple y col. 2010).

En relación a la información cuantitativa obtenida en este estudio, lo primero para destacar es que el 50 % de los niños de hasta 2 años evaluados, nunca habían consumido bebidas con cafeína, mientras que, de los de 3 años en adelante, más del 90 % sí consumieron regularmente alguna bebida con cafeína. Se hace evidente que, entre los 2 y los 3 años, se produce un cambio en cuanto al consumo de bebidas con cafeína. Por otro lado, las ingestas promedio calculadas para los niños y adolescentes evaluados resultaron ser superiores

a las reportadas por otros autores para otros países. En esta comparación (Tabla 6) se consideraron: una recomendación (Health Canada 2013) y siete estudios, tres de Estados Unidos de América (Ellison y col. 1995; Skinner y col. 2000; Warzak y col 2011), uno de España (Pardo Lozano y col. 2007), uno de Perú (Osada y col. 2008), uno del Reino Unido de Gran Bretaña (Heatherley y col. 2006) y uno de Croacia (Valek y col. 2004), cada uno abarcó un grupo etario en particular, salvo el caso del estudio de Pardo Lozano y colaboradores donde se informa un valor de ingesta promedio de 1 mg/kg/día para la franja de menores de 18 años. En otros dos estudios realizados en Estados Unidos de América en adolescentes de entre 12 y 18 años (Bernstein y col. 2002; Calamaro y col. 2009) se informaron ingestas promedio superiores a las obtenidas en este trabajo, aunque en el caso del estudio realizado por Bernstein y colaboradores (2002) el promedio corresponde a adolescentes que fueron convocados por ser consumidores de cafeína, lo cual pudo resultar en un valor no representativo de la población total de esa franja etaria. No se encontró asociación entre el género y la ingesta diaria de cafeína lo cual coincide con lo encontrado por otros autores (Ellison y col. 1995, Valek y col. 2004, Temple y col. 2009) para algunas de las mismas franjas etarias. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por estos mismos autores, en este trabajo las ingestas promedio de las mujeres fueron mayores a las de los varones (diferencia estadísticamente no significativa).

Tabla 6. Ingestas promedio obtenidas en este estudio, según las distintas franjas etarias, y comparación con otros países.

Edad (años)	Ingestas promedio (mg/día y mg/kg/día)		Health Canada 2013	Estados Unidos (Ellison y col. 1995)	Estados Unidos (Skinner y col. 2000)	Estados Unidos (Warzak y col. 2011)	España (Pardo Lozano y col. 2007)	Perú (Osada y col. 2008)	Reino Unido (Heatherley y col. 2006)	Croacia (Valek y col. 2004)
hasta 2	11	0,8								
3 a 5	43	2,3	4 a 6 años, hasta 45 mg/día		2 a 3 años, 3,8 a 13,4 mg/día (n=124)					
6 a 12	76	2,4	7 a 9 años, hasta 62,5 mg/día; 10 a 12 años, hasta 85 mg/día	2 a 10 años, 16 mg/día (n=96)		5 a 12 años, 52 a 109 mg/día (n=228)	menores de 18 años 1 mg/kg/día		9 a 11 años, 12 a 109 mg/día (n=26)	
13 a 17	132	2,3	13 años y mayores, hasta 2,5 mg/kg/día							14 a 15 años, 59,8 a 64,6 mg/día (1 a 1,1 mg/kg/día) (n=571)
18 a 20	233	3,8						17 a 23 años, 147 mg/día (n=348)		

Las bebidas que se mostraron como principales contribuyentes a la ingesta promedio de cafeína fueron las bebidas cola, lo cual coincide con lo informado por otros autores (Ellison y col. 1995, Bernstein y col. 2002, Válek y col. 2004, Pardo Lozano y col. 2007). La diferencia que se observa en Argentina con respecto a otros países radica en la contribución del mate, sobre todo en las edades mayores donde se muestra como contribuyente mayoritario (del 18 al 28 %). Por otro lado, el consumo de bebidas energizantes fue muy bajo en la población estudiada (7 %) en relación a lo publicado para otros países (entre 30 y 50 %) (Seifert y col. 2011).

No se encontraron trabajos que relacionen la ingesta de cafeína con el NSE para la población infantil o adolescente. La mayor ingesta observada en este estudio para el NSE bajo no ha sido descripta previamente, sin embargo, en un trabajo realizado por Kyle y col. (2010) se obtuvo la misma asociación en adultos mayores. La asociación observada no pudo explicarse por la composición de la ingesta, ni por ninguno de los otros factores analizados (edad, género o lugar de residencia).

La asociación entre la ingesta diaria de cafeína y el lugar de residencia no mostró diferencias entre CABA, Conurbano y PBA, y el interior del país. Sin embargo, al contrario de lo esperado, el mate fue el contribuyente mayoritario en CABA con más del 40 % del aporte, mientras que en el interior del país el aporte fue del 30 %.

La influencia de la ingesta de cafeína en la duración y la calidad del sueño de niños y adolescentes ha sido descripta en varios trabajos. Orbeta y col. (2006) concluyeron que una ingesta alta (considerando como alta el cuartil superior) de cafeína en adolescentes (principalmente a partir de gaseosas) se correlacionó con dificultad para dormir. Otro estudio, que analizó el estilo de vida de los adolescentes, con ingesta promedio de cafeína de 144 mg/día (Calamaro y col. 2009), encontró que el 80 % de los adolescentes estudiados dormían menos de 8 h diarias y el 33 % mostró dificultades en el sueño. Drescher y col. (2011) encontraron asociación entre el consumo de cafeína y la disminución del tiempo de sueño pero solo en adolescentes (mayores de 13 años). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró relación entre la ingesta de cafeína y las horas de sueño, ni siquiera para los grupos con ingesta extrema (percentiles 95 a 100). Solo en el caso de la

franja etaria de 18 a 20 años se observó una disminución significativa en la duración promedio del sueño para el grupo de individuos con ingesta extrema.

Si bien los resultados obtenidos en este estudio se obtuvieron a partir de un número pequeño de datos, su distribución entre sexos, NSE y grupo etario dentro de la población objetivo, así como la falta de información local en relación a la distribución y composición de la ingesta de cafeína en niños y adolescentes los hace valiosos.

Como conclusiones de este trabajo es pertinente destacar que se logró caracterizar la composición de la ingesta de cafeína en cuanto a sus contribuyentes mayoritarios y minoritarios, información de suma utilidad para, en caso de ser necesario, implementar acciones o políticas que resulten en una disminución de la ingesta. Particularmente paradójico resulta que la duración del sueño, el marcador de efecto evaluado en este estudio, no mostró asociación con la ingesta de cafeína. Por último, si bien es posible clasificar a las ingestas promedio obtenidas en este estudio como elevadas, con respecto a las reportadas para otros países, se debe considerar que no se ha definido un valor de ingesta diaria recomendada para niños y adolescentes.

Bibliografía citada

Ahn H.Y., Karaki H., Urakawa N. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988;93(2):267-274.

Ahuja J.K.C., Perloff B.P. Caffeine and Theobromine Intakes of Children Results From CS-FII 1994-96, 1998. *Family Economics and Nutrition Review.* 2001;13(2):47-51.

Arbeit M.L., Nicklas T.A., Frank G.C., Webber L.S., Miner M.H., Berenson G.S. Caffeine intakes of children from a biracial population: the Bogalusa Heart Study. *J Am Diet Assoc.* 1988;88(4):466-71.

Bello L.L., Al-Hammad N. Pattern of fluid consumption in a sample of Saudi Arabian adolescents aged 12-13 years. *Int J Paediatr Dent.* 2006;16(3):168-73.

Berkowitz B.A., Tarver J.H., Spector S. Release of norepinephrine in the central nervous

system by theophylline and caffeine. *Eur J Pharmacol.* 1970;10(1):64-71.

Bernstein G.A., Carroll M.E., Thuras P.D., Cosgrove K.P., Roth M.E. Caffeine dependence in teenagers. *Drug Alcohol Depend.* 2002;66(1):1-6.

Calamaro C.J., Mason, T.B.A., Ratcliffe S.J. Adolescents Living the 24/7 Lifestyle: Effects of Caffeine and Technology on Sleep Duration and Daytime Functioning. *Pediatrics.* 2009;123(6):1005-1010

Calamaro C.J., Yang K., Ratcliffe S., Chasens E.R. Wired at a young age: the effect of caffeine and technology on sleep duration and body mass index in school-aged children. *J Pediatr Health Care.* 2012;26(4):276-282.

Cámara de Control de Medición de Audiencia (CCMA). Nueva clasificación del nivel socio-económico argentino. Portal Publicitario [en línea]. 2007.[Consulta: 6 de noviembre de 2009] Disponible en: <http://www.portalpublicitario.com/content/view/1074/110>.

Camargo M.C., Toledo M.C.F., Farha H.G. Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. *Food Addit Contam.* 1999;16(2):79-87.

Castellanos F.X., Rapoport J.L. Effects of caffeine on development and behavior in infancy and childhood: a review of the published literatura. *Food and Chemical Toxicology.* 2002;(40):1235-1242

Drescher A.A., Goodwin J.L., Silva G.E., Quan S.F. Caffeine and screen time in adolescence: associations with short sleep and obesity. *J Clin Sleep Med.* 2011;15;7(4):337-42.

Echeverri D., Montes F.R., Cabrera M., Galán A., Prieto A. Caffeine's vascular mechanisms of action. *International Journal of Vascular Medicine.* 2010:1-10

Ellenhorn M.J. 1997. *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, second edition. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins. Chapter 52, Over-the-counter products drug interactions; p. 980-1035.

Ellison R.C., Singer M.R., Moore L.L., Nguyen U.S., Garrahe E.J., Marmor J.K. Current caffeine intake of young children: amount and sources. *J Am Diet Assoc.* 1995;(7):802-4.

Farag N.H., Vincent A.S., Sung B.H., Whitsett T.L., Wilson M.F., Lovallo W.R. Caffeine tolerance is incomplete: persistent blood pressure responses in the ambulatory setting. *Am J Hypertens.* 2005;18(5):714-719.

Feferbaum R., de Abreu L.C., Leone C. Fluid intake patterns: an epidemiological study among children and adolescents in Brazil. *BMC Public Health.* 2012;12:1005.

Fredholm B.B., Batig K., Holmen J., Nehlig A., Zvartau E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51(1):83-133.

Gómez-Gómez M., Danglot-Banck C., Vega-Franco L. Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuándo usarlas. *Revista Mexicana de Pediatría.* 2003;70(2):91-9.

Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.

Health Canada. 2013 Health Canada Reminds Canadians to Manage Their Caffeine Consumption [en línea] 2013. [Consulta: 10 de junio de 2014]. Disponible en: <http://healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2013/34021a-eng.php>

Heatherley S.V., Hancock K.M., Rogers P.J. Psychostimulant and other effects of caffeine in 9- to 11-year-old children. *J Child Psychol Psychiatry.* 2006;47(2):135-142.

Heckman M.A., Weil J., González de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci.* 2010;75(3):77-87.

Higdon J.V., Frei B. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2006;46(2):101-123.

- Kyle J., Fox H.C., Whalley L.J. Caffeine, Cognition, and Socioeconomic Status. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;20:S151-S159.
- Meltzer H.M., Fotland T.O., Alexander J., Elind E., Hallstrom H., Lam H.R., Liukkonen K-H., Petersen M.A., Solbergsdottir E.J. Risk assessment of caffeine among children and adolescents in the Nordic countries. *Tema-Nord Series Copenhagen: Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 2008*.
- Nawrot P., Jordan S., Eastwood J., Rotstein J., Hugenholtz A., Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Additiv Contam*. 2003;20(1):1-30.
- Nehlig, A.; Daval, J.L.; Debry, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992;17(2):139-70.
- Olmos V., Bardoni N., Ridolfi A.S., Villaamil Lepori E.C. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. *Food Addit and Contam. Part A*. 2009;26(3):275-281.
- Orbeta R.L., Overpeck M.D., Ramcharran D., Kogan M.D., Ledsky R. High caffeine intake in adolescents: associations with difficulty sleeping and feeling tired in the morning. *Journal of Adolescent Health*. (2006);38:451-453.
- Osada Liy J.E., Rojas Villegas M.O., Rosales Vásquez C.E., Vega Dienstmaier J. Consumo de cafeína en estudiantes de medicina y su coexistencia con sintomatología ansiosa y depresiva. *Rev Med Hered*. 2008;19(3):102-107.
- Pardo Lozano R., Alvarez García Y., Barral Taffalla D., Farré Albaladejo M. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*. 2007;19(3):225-238.
- Pincomb G.A., Lovallo W.R., Passey R.B., Whitsett T.L., Silverstein S.M., Wilson M.F. Effects of caffeine on vascular resistance, cardiac output and myocardial contractility in young men. *Am J Cardiol*. 1985;56(1):119-122.
- Pincomb G.A., Sung B.H., Lovallo W.R., Wilson M.F. Consistency of cardiovascular response pattern to caffeine across multiple studies using impedance and nuclear cardiography. *Biol Psychol*. 1993;36(1-2):131-138.
- Pollak C.P., Bright D. Caffeine consumption and weekly sleep patterns in US seventh-, eighth-, and ninth-graders. *Pediatrics*. 2003;111(1):42-6.
- Savoca M.R., MacKey M.L., Evans C.D., Wilson M., Ludwig D.A., Harshfield G.A. Association of ambulatory blood pressure and dietary caffeine in adolescents. *Am J Hypertens*. 2005;18(1):116-20.
- Seifert S.M., Schaechter J.L., Hershoin E.R., Lipshultz S.E. Health effects of energy drinks on children, adolescents, and young adults. *Pediatrics*. 2011;127(3):511-28.
- Skinner J.D., Carruth B.R., Houck K.S., Morris M., Moran J., Coletta F. Caffeine intake in young children differs by family socioeconomic status. *J Am Diet Assoc*. 2000;100(2):229-231.
- Smith A. Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(9):1243-55.
- Temple J.L. Caffeine use in children: What we know, what we have left to learn, and why we should worry. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2009;33:793-806.
- Temple J.L., Bulkley A.M., Briatico L., Dewey A.M. Sex differences in reinforcing value of caffeinated beverages in adolescents. *Behav Pharmacol*. 2009;20(8):731-41.
- Temple J.L., Dewey A.M., Briatico L.N. Effects of acute caffeine administration on adolescents. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2010;18(6):510-20.
- Turley K.R., Bland J.R., Evans W.J. Effects of Different Doses of Caffeine on Exercise Responses in Young Children. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;40(5):871-8
- Usman A., Jawaid A. Hypertension in a young boy: an energy drink effect. *BMC Res Notes*. 2012;5:591.

Valek M., Laslavic B., Laslavic Z. Daily caffeine intake among Osijek High School students: questionnaire study. *Croat Med J.* 2004;45(1):72-75.

Warzak W.J., Evans S., Floress M.T., Gross A.C., Stoolman S. Caffeine consumption in young children. *J Pediatr.* 2011;158(3):508-509.

Metallothionein and lipid peroxidation as markers to assess health status of chronically oiled Magellanic penguins in Argentina
Metalotioneínas y peroxidación lipídica como marcadores para determinar el estado de salud del Pingüino Magallánico crónicamente empetroado en Argentina

Romero, María Belén^{*1,2}; Polizzi, Paula^{1,2}; Chiodi, Leila²; Robles, Alicia^{1,2}; Rodríguez Heredia, Sergio³; Gerpe, Marcela^{1,2}

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. +54 223 475 2426 ext. 455. ²Toxicología Ambiental, Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3350, 7600 Mar del Plata, Argentina. ³Fundación Mundo Marino, Av. N° 157, San Clemente del Tuyú, Argentina.

*mabelenromero@gmail.com

Recibido: 15 de julio de 2014

Aceptado: 22 de diciembre de 2014

Abstract. Chronic oiling affects seabirds, with short (individual survival) and long-term (dynamics of population) effects. Magellanic penguin is the most affected species in Argentina. The aim was to evaluate the use of blood biochemical-molecular biomarkers (MT and TBARS) to assess health status of Magellanic penguin exposed to chronic environmental oiling, in addition with routine hematological analyses (differential WBC count and PCV). Oiled specimens presented significant higher RBC metallothionein and TBARS concentrations than those from shelter; while routine hematological parameters were within normal levels for penguins and did not show any difference between both groups. These results demonstrated the higher sensibility of both biomarkers, evidencing effects on health status by chronic oiling; furthermore, they are the first report in blood metallothionein and oxidative stress in *S. magellanicus*. These studies will be useful for a better assessment of the health condition in rehabilitation centers (short term); and, as early warning signals in natural colonies (long term).

Keywords: Chronic oiling; Metallothionein; Lipid peroxidation; Magellanic penguin.

Resumen. El empetrolamiento crónico afecta a las aves marinas, con efectos a corto (supervivencia del individuo) y largo plazo (dinámica de la población). El pingüino de Magallanes es la especie más afectada en Argentina. El objetivo fue evaluar el uso de biomarcadores bioquímicos-moleculares (MT y TBARS) en sangre para evaluar el estado de salud del pingüino de Magallanes expuesto a empetrolamiento crónico ambiental, además de los análisis hematológicos de rutina (recuento diferencial de leucocitos y hematocrito). Los ejemplares empetrolados presentaron concentraciones significativamente mayores de metalotioneínas en fracción celular y peroxidación lipídica que aquellos de albergue; por el contrario, los parámetros hematológicos de rutina estuvieron dentro de los niveles normales para los pingüinos y no mostraron ninguna diferencia entre los grupos. Estos resultados demuestran la mayor sensibilidad de los dos biomarcadores, evidenciando efectos del empetrolamiento crónico sobre el estado de salud; además, este es el primer reporte de concentraciones de metalotioneínas en sangre y el estrés oxidativo en *S. magellanicus*. Estos estudios son de utilidad para una mejor evaluación del estado de salud en los centros de rehabilitación (corto plazo); y, como señales de alerta temprana en las colonias naturales (largo plazo).

Palabras clave: Empetroamiento crónico; Metalotioneínas; Peroxidación lipídica; Pingüino magallánico.

Introduction

Biomarkers are responses of organisms to environmental stress, considering it as a destabilization of the dynamic equilibrium (homeostasis). These responses are considered as “early warning signals”, due to they are manifested at the slightest sign of environmental disturbance. The determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is one of the methods to assess oxidative stress caused by different stressors. TBARS are indicative of the formation

of malondialdehyde (MDA), an end-product of membrane lipid peroxidation; therefore, it is considered as biomarker of effect for this kind of stress (Janero 1990). Metallothioneins (MT) are low-molecular weight proteins rich in cysteine that bind metals and are found in all animal phyla. MT plays a primary role in the homeostasis of essential metals, such as copper (Cu) and zinc (Zn). However, nonessential metals, particularly cadmium (Cd), are also able to induce MT synthesis (Roesijadi 1996; Amiard et al. 2006). On the other hand,

hematological parameters, mainly differential white blood cells (WBC) counts and packed cell volume (PCV) are traditionally considered as indicators of health status in birds (Moreno et al. 2002; Russell et al. 2003).

Chronic oil pollution (small but frequent discharges) accounts the most petroleum pollution in the ocean (USNRC 2003). Seabirds are one of the most vulnerable groups of marine animals affected by oil pollution (Clark 1984; Dunnet 1987; Piatt et al. 1990). Oil destroys the water-proofing quality of the feathers and cause loss of buoyancy and insulation (Ambrose 1990). Their feeding is reduced or absent, further weakening their body condition and fat reserves. If close to shore, birds may choose to go on land to escape or reduce the effects of hypothermia (Camphuysen 2006). It was also reported that oiling can cause skin irritation, ulceration in eyes, skin, mouth and nose, poisoning and intoxication in birds (Leighton 1986, 1993; Balseiro et al. 2005; AMSA 2007). Furthermore, it can depress avian immune system (Briggs et al. 1997) resulting in increased parasitic diseases (Gandini et al. 1994). Oiling has also been linked to oxidative stress (Reish et al. 1999; Pérez et al. 2010). It has been proposed that oxidative damage during development may potentially constrain organisms' fitness in adulthood (Mangel and Munch 2005) being a key element of the population dynamics (Noguera et al. 2011).

Penguins are most vulnerable and sensitive to oil pollution than other seabirds, since they don't fly and are less able to detect and avoid petroleum than other seabirds (Gandini et al. 1994). Along the coast of Argentina, chronic oil pollution is the main problem that penguins have to face (Gandini et al. 1994); and the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) is the most abundant species in this area. They have a non-breeding season between April and September, where they migrate from colonies in the south of Argentina to Buenos Aires province, Uruguay and Brazil, in the north. These migratory routes in the Atlantic Ocean overlap with heavy maritime traffic and petroleum development (Stokes and Boersma 1998; Pütz et al. 2000). Magellanic penguin conservation status is Near Threatened (IUCN 2014). On the other hand, oil pollution is likely contributing to the long-term decline at the largest Magellanic penguin colony at Punta Tombo, Argentina, where ac-

tive nests have declined over 20% since 1987 (Boersma 1997; 2008). It has even been reported that there may be a reduction of circulating hormones affecting reproduction of *Spheniscus magellanicus* (Fowler et al. 1995). Therefore, due to the stress affects development and reproduction in animals and that their effects involve the conservation of species, the aim of this study was to evaluate the use of blood biochemical-molecular biomarkers (MT and TBARs) to assess health status of Magellanic penguin exposed to chronic environmental oiling, in addition with routine hematological analyses (differential WBC count and PCV).

Materials and methods

Sampling

The animals were cared for in accordance with guidelines of the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals of Mar del Plata University (CICUAL) based on the "Guide for the Care and Use of laboratory Animals" (2010, 8th Edition, National Research Council, The National Academies Press, Washington DC) and Directive 2010/63/UE of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes.

Peripheral blood samples of adults oiled, recovering and shelter penguins from Fundación Mundo Marino (FMM, San Clemente del Tuyú, Argentina) were taken during May-July 2011. The average height of all penguins was 45 cm, and the average weight of oiled penguins was between 2 and 3 kg, while penguins in recovery and shelter were between 3 and 5 kg.

Oiled penguins (OLP; N=20) were rescued by the FMM in the beaches of Buenos Aires province (36 ° 22 'S / 56 ° 44' W), Argentina; and corresponded to individuals in non-breeding season, during their trophic migration from reproductive colonies of southern Argentina (Figure 1). OLP came ashore as results of their disability for thermoregulate. They were partially covered with oil and without compromise of the digestive system. Sampling was performed before washing them. Recovering penguins (RECP; N=27), which had been previously oiled, were treated in the rehabilitation center to be successfully reintegrated into the environment; they were sampled before reintegration. And finally, 64 penguins, which lived in FMM shelter (SHEP), were also sampled. They lived in a stable colony and they reproduced successfully.

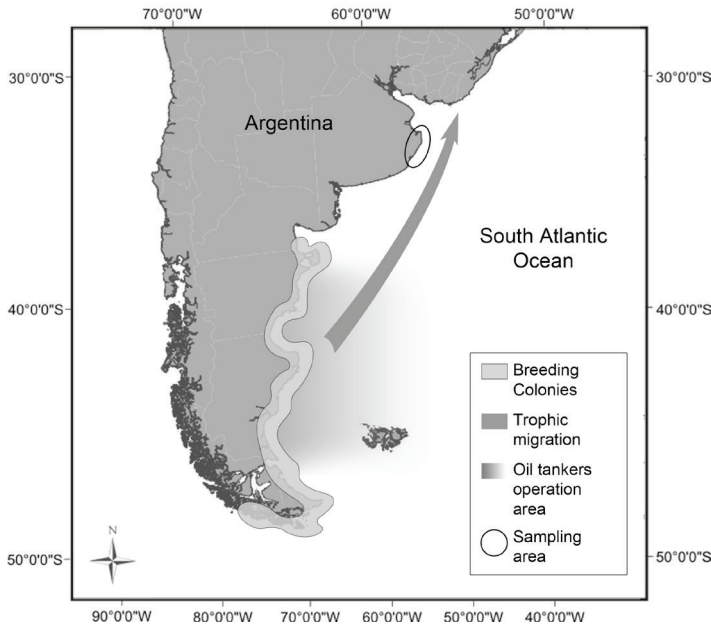


Figure 1. Distribution of breeding colonies of *S. magellanicus* in the southern coast of Argentina, showing trophic migration and oil activity area in Argentina shelf.

Blood was obtained by drawn from the metatarsal vein of the hind leg. One (1) ml of blood was collected in clean microcentrifuge tubes to obtain serum samples and another ml of blood was collected in tubes containing sodic heparin for red blood cell (RBC) fraction. All tubes were immediately centrifugated for 10 min at 3000 rpm for blood separation. After this, samples were frozen with liquid nitrogen and storage at -80°C until processing.

At the same time, a thin layer of blood was smeared on individual slides, air-dried, fixed *in situ* with methanol and, once in the laboratory, they were stained with Giemsa for 45 min. Slides were observed at microscope (1,000x with oiled immersion) to perform differential WBC count and quantify the relative percentage of the most abundant cells in avian blood: heterophils (H) and lymphocytes (L) (Clark et al. 2009). PCV was quantified by determining the microhematocrit technique; results provided by the Rehabilitation Centre of FMM.

Lipid peroxidation (LPO)

MDA, as final product of LPO, was measured by the TBARS assay, according to the method described by Oakes and Van Der Kraak (2003) with modifications to avoid pyridine. Briefly, 100 μl of serum were homogenized in 1.15% KCl containing butylated hydroxytolu-

ene (BHT) as antioxidant to prevent formation of TBARS in sample manipulation. After that, butanol was added and the homogenate was centrifugated, the immiscible organic layer was removed and the formed chromogen was measured by UV-Vis Spectrometry at 532 nm. The concentration was expressed as nmol of TBARS per μl of serum, which was calculated using the $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kosugi et al. 1991).

Metallothionein assay

The MT assay was performed according to the spectrometric method described by Viarengo et al. (1997). The absorbance was read at 412 nm, and MT concentration was quantified using reduced glutathione (GSH) as a reference standard. The amount of MT was calculated based on cysteine content in rabbit (18 cysteines/mol), assuming a similar SH group content in Magellanic penguin MT. Concentration was reported as nmol MT per μl of RBC.

Metals determination

Cu and Zn concentration was determined by Atomic Absorption Spectrometry (Perkin-Elmer Analyst 300, Massachusetts, USA). Samples were digested with perchloric and nitric acid (1:3) according to the FAO/SIDA method (1983). A Certified Reference Material LUTS-1 (Lobster hepatopancreas from the National Research Council of Canada) was used to validate results. A blank, treated under the same conditions of samples and Certified Reference Material, was also performed. Results were expressed in μg per ml RCB.

Statistical analyses

The statistical analyses were performed using the software Statistica[®] 6.0 (Statsoft, Inc.). The differences between states were checked by the parametric ANOVA test, being previously ascertain the variance homogeneity by Levene's test. The significance level was $p < 0.05$. The Pearson correlation test was performed between Zn and Cu concentration vs. MT levels.

Results and Discussion

Metallothioneins and essential metals

MT blood levels reported here for *S. magellanicus* constitute the first record for penguin species. OLP presented higher ($p < 0.0001$) RBC MT levels ($48.1 \pm 15.8 \text{ nmol.ml}^{-1}$) than RECP ($23.0 \pm 15.0 \text{ nmol.ml}^{-1}$) and SHP ($17.8 \pm 11.1 \text{ nmol.ml}^{-1}$) (Figure 2a); there were no statistical differences between RECP y SHP.

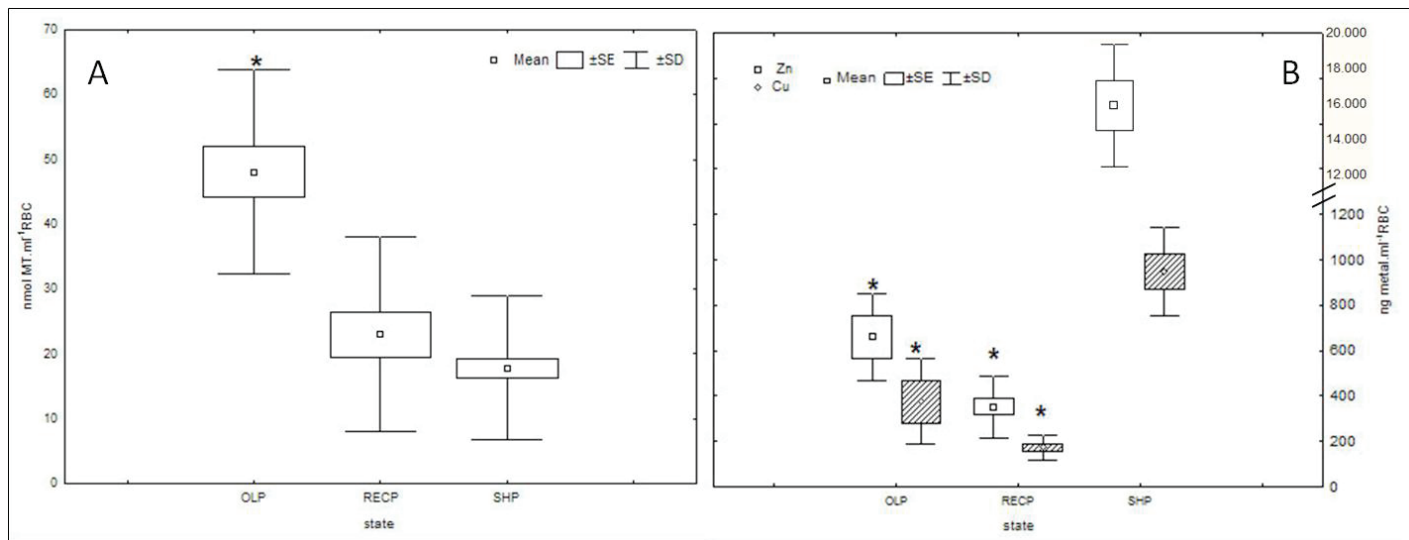


Figure 2. MT (nmol.ml⁻¹; A) and Cu and Zn (ng.ml⁻¹; B) concentrations in RBC according to states in *S. magellanicus*. *indicated significant difference with SHP.

MT are cytosolic proteins characterized by a high content of thiol groups (-SH) due to the high percentage of cysteine residues, binding up to seven atoms of divalent metals. They are involved in the homeostasis of essential metals such as Cu and Zn, and their detoxification when they are above physiological levels, and those non-essential highly toxic metals (Vallee 1995).

MT synthesis could be induced by physic and physiologic stress conditions such as fasting and starving, like a mechanism for conservation of metals in the body (Richards et al. 1987; Debacker et al. 2001; Kondoh et al. 2003) but MT were not seem to be induced by a normal dietary intake of essential metals (Coyle et al. 2002). It has been reported that oiled specimens come ashore, and as a result, there is a reduction in the feed rate causing starvation and decreased body weight (Culik et al. 1991). This situation could lead to the MT levels found in the different states in Magellanic penguins.

Zn concentrations were significantly higher than those from Cu for all studied states ($p < 0.05$) (Figure 2b). Cu and Zn had an important role in biochemical functions (Ma and Betts 2000). In the blood of birds, the essentiality of Zn is directly related to the activity of carbonic anhydrase (Holm et al. 2001), meanwhile, Cu is linked to the maintenance of blood vessel resistance and synthesis of hemoglobin (Harris 2001). While both metals are

essential, Zn participates in the activation of a significantly higher number of enzymes compared to Cu (over 300 enzymes) (Sandstead 1978). The mentioned situation could be responsible for the presence of higher Zn than Cu concentrations in Magellanic penguin.

Significant differences between penguin groups were found for each metal. Zn and Cu levels were higher ($p < 0.05$) in SHP ($14,700 \pm 3,122$ ng.ml⁻¹; 948 ± 197 ng.ml⁻¹ respectively) than OLP (Zn = 661 ± 190 ; Cu = 377 ± 188 ng.ml⁻¹) and RECP (Zn = 357 ± 137 ; Cu = 172 ± 57 ng.ml⁻¹) (Figure 2b). Richards et al. (1986) reported that Zn and Cu blood concentration in turkey decline in 58% and 63%, respectively, after a period of starvation. Therefore, a re-feeding after this period did not show a return of metals concentration to control levels. On the other hand, it has been reported that excretion of Zn and Cu increase drastically during starvation (Jackson et al 2006). Therefore, it is not surprising to find lower concentration of these essential metals in OLP and RECP compared to SHP.

Zn and Cu levels were significant higher ($p < 0.05$) in OLP compared to RECP. The main effect of oiling in birds is the change in feathers' structure, losing impermeability with the consistent disability of thermal isolation and producing hypothermia (Jenssen 1994). There is an increase in metabolic rate to counteract the decrease of body temperature affecting buoyancy (Culik et al. 1991). In fact, on land,

increased heat loss results also in increased metabolic rates and fat consumption. It is known that essential metals, such as Zn and Cu, are involved in maintenance of metabolic rate (Klaasen 2001). For example Zn participates in the synthesis and degradation of carbohydrates, lipids, proteins and nucleic acids (Parkin 2004); and Cu enzymes are involved in a variety of metabolic reactions such as utilization of oxygen during cell respiration (Valko et al. 2005). Furthermore, both metals are also required for synthesis and activation of an important enzyme, superoxide dismutase (SOD) (Mozo et al. 2005; Sahin et al. 2009), which is relevant in antioxidant systems. Therefore, higher Zn and Cu concentration in OLP than RECP could be due to the increased metabolic rate for heat production.

MT pattern in RBC is correlated with Zn ($p < 0.05$; $r = 0.54$) and Cu ($p < 0.05$; $r = 0.72$) concentration only in OLP and RECP. This result evidenced that MT in RCB is related to the requirements of these metals and they could be good biomarkers of the condition index in oiled and recovering penguins.

Lipid peroxidation

The information presented in this study is the first report about biomarkers of oxidative stress in blood of *S. magellanicus*, from Argentina. TBARs levels found in OLP (1.6 ± 0.3 nmol. μl^{-1}) and RECP (1.8 ± 0.4 nmol. μl^{-1}) were significantly higher ($p < 0.0001$) than those from SHP (0.3 ± 0.1 nmol. μl^{-1}) (Figure 3).

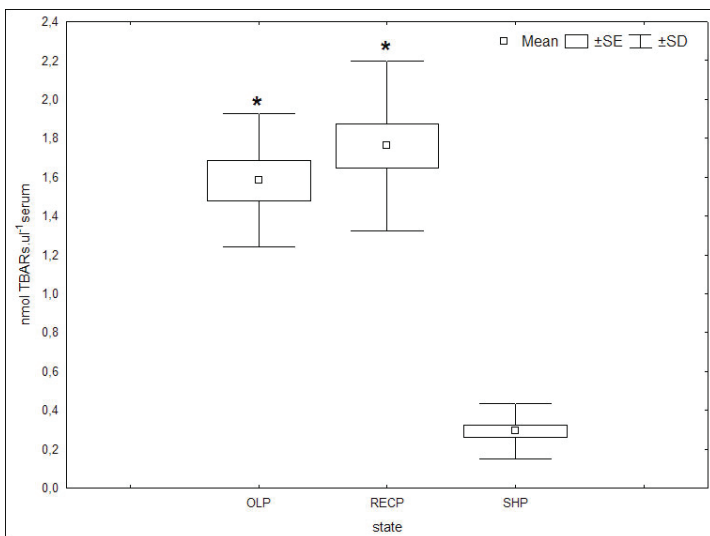


Figure 3. TBARS concentrations ($\mu\text{mol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) according to states in *S. magellanicus*. *indicated significant difference with SHP.

Oxidative stress results from a mismatch between the production of damaging reactive oxygen species (ROS) and the organism's capacity to mitigate their damaging effects (Monaghan et al. 2009); and oxidants are generated from normal intracellular metabolism in cells (Finkel and Holbrook 2000). It is a potentially important physiological cost implicated in life-history trade-offs (Monaghan et al. 2009) and senescence (Finkel and Holbrook 2000). While chronic exposure to oil is not lethal, even brief exposure of migrating shore birds to repeatedly cleaned but re-oiled shorelines, could lead to reduced survival during migration or decreased reproductive success at nesting grounds (Burger and Tsipoura 1998).

The relation between oiling and oxidative damage is documented. Petroleum products containing high concentrations of polyaromatic hydrocarbons which likely cause oxidative damage to cellular organelles, membranes and proteins (Newman et al. 1999; Gonzalez 2005). Pérez et al. (2010) observed an increase in lipid peroxidation levels in gulls fed with a supplementary diet containing heavy fuel oil from the Prestige oil spill compared to control; although they were not statistically different, suggesting a protective role of vitamin E as antioxidant. Despite the direct effect of oil in the production of oxidative damage, the situations mentioned in section 3.1 (increased metabolic rate; starvation and disability of thermoregulation) produce an increase in the production of ROS and this could be reflected in higher levels of LPO (Lindgard et al. 1992; Finkel and Holbrook 2000; Mozo et al. 2005).

It had been reported that MT could act as part of the antioxidant system (Prior and Cao 1999; Viarengo et al. 2000; Sato and Kondoh 2002). The pattern of MT and LPO observed in Magellanic penguin, suggested that MT had no role in decrease oxidative damage levels, and they were only involved with essential metals.

Based on the results, the oxidative damage caused by chronic oiling could not be remediated with rehabilitation treatment, despite of the recovery of homeostasis; suggesting that other actions should be taken to reduce levels of LPO in penguins, such as administration of antioxidants in food (e.g. vitamin E).

Hematological parameters

OLP and RECP showed similar patterns in percentages of H and L ($p > 0.05$) (Figure 4).

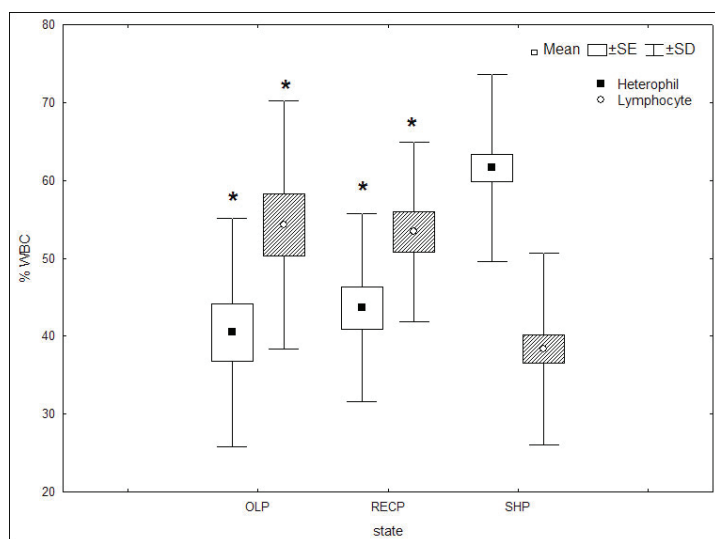


Figure 4. Relative percentages of heterophils and lymphocytes according to states in *S. magellanicus*. *indicated significant difference with SHP.

Percentages of lymphocytes (OLP: $54.3 \pm 16.0\%$; RECP: $53.4 \pm 11.5\%$) were higher than heterophils (OLP: $40.5 \pm 14.7\%$; RECP: $43.6 \pm 12.1\%$) in both groups. These percentages were within the parameters previously reported for wild Magellanic penguins by Hawkey et al. (1989), and other penguin species (Gentoo -*Pygoscelis papua*- and Rockhopper penguin -*Eudyptes crestatus*-; Hawkey et al. 1989).

Percentages of heterophils in SHP ($61.6 \pm 12.0\%$) were higher than those for lymphocytes ($38.3 \pm 12.4\%$) ($p < 0.05$) (Figure 4). This situation was previously reported by Hawkey et al. (1989) for captive rockhopper and gentoo penguins, where H was the most numerous white cell present in captive specimens, in comparison with wild penguins, where the most abundant WBC was lymphocyte. Stoskopf et al. (1983) and Villouta et al. (1997) also reported higher H than L in captive African Blackfoot penguin (*Spheniscus demersus*) and Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*), respectively.

Clinical hematology is one of the most informative procedures to assess health status in birds (Bowerman et al. 2000; Moreno et al. 2002; Russell et al. 2003; Quillfeldt et al. 2004). Among them, PCV and leukocyte count are the most frequently measured variables in wild bird health assessment, due to they reflect the efficiency of oxygen carrying capacity and the immune system status, respectively (Artacho et al., 2007). Lymphocytes

and heterophils are the most abundant types of leucocytes of avian blood, and changes in these parameters can reflect responses of an organism to stressful agents (Campbell 1995). Therefore, differential cell count indicated that no petroleum-induced inflammatory response occurred in studied penguins, and H and L percentages did not exceed reference intervals for the species. Although avian species can develop leukocytosis, heterophilia and lymphopenia in association with stress (Campbell 1995); these changes could not be observed in this study.

There were not significant differences ($p > 0.05$) between states for PCV values (Table 1).

Table 1. Pack Cell Volume percentages according to states in *S. magellanicus*.

State	PCV (%)
OLP	42.9 ± 5.7
RECP	41.8 ± 4.7
SHP	44.0 ± 3.2

These percentages were according with the proportion reported for wild specimens of the species (Hawkey et al. 1989), and in another penguin species (Hawkey et al. 1989; Merino and Barbosa 1997; Nicol et al. 1988).

Newman et al. (1999) also found no significant differences between oil-exposed marine birds and control for PCV and cell counts of heterophils and lymphocytes, among other blood parameters. These findings supported the results of this study, indicating that traditional hematologic parameters were not good biomarkers for chronic oiling affection in Magellanic penguin as it was proposed by international protocols (Russell et al. 2003).

Conclusion

MT y TBARS presented more sensibility to chronic oiling in comparison with hematological parameters, constituting good biomarkers of this problematic and an important tool to implement in rehabilitation centers. These types of analyses allowed a better understanding of the overall health status of penguins. Therefore this information will allow to improve the treatment (e.g., dietary supplements rich in antioxidants such as vitamin E), and to control in the evolution of penguins to

be returned to the environment. These parameters could also be used as early warning signals of potential problems in natural colonies, to prevent effects on reproduction, survival and fitness.

Acknowledgements

The study was funded by the following grants: EXA 523/10 and EXA 592/12 from Mar del Plata University, and PIP 2010/0348 from CONICET. We gratefully acknowledge to Fundación Mundo Marino to allow us sampling oiled penguins from the rehabilitation center and the Institute of Analyses Fares Taie for metals determination. Authors are also very grateful to Mr. Lautaro Rodriguez Gerpe for his assistance in the design of figures.

References

- Ambrose R. Rapeseed oil kills waterbirds. *Marine Poll Bull.* 1990;21(8):371.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol.* 2006;76:160–202.
- Artacho P., Soto-Gamboa M., Verdugo C., Nespolo R. F. Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of an endangered black-necked swan population. *Comp Biochem Physiol A.* 2006;147:1060–1066.
- Australian Maritime Safety Authority (AMSA) [online] Canberra [accessed May 13, 2007]. Available at: <http://www/EffectsofMaritimeOilSpillsonWildlife.htm>
- Balseiro A., Espí A., Márquez I., Pérez V., Ferreras M.C., García Marín J.F., Prieto J.M. Pathological features in marine birds affected by the Prestige's oil spill in the North of Spain. *J Wildl Dis.* 2005;41(2):371-378.
- Bize P., Devevey G., Monaghan P., Doligez B., Christie P. Fecundity and survival in relation to resistance to oxidative stress in free-living bird. *Ecology.* 2008;89(8): 2584-2593.
- Boersma P.D. Magellanic penguins decline in South Atlantic. *Penguin Conservation.* 1997;10:2–5.
- Boersma P.D. Penguins as Marine Sentinels. *BioScience.* 2008;58(7):597-607.
- Bowerman W.W., Stickle J.E., Sikarskie J.G., Giesy J.P. Hematology and serum chemistries of nestling bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) in the lower peninsula of MI, USA. *Chemosphere.* 2000;41:1575-1579.
- Briggs K., Gershwin M., Anderson D. Consequences of petrochemical ingestion and stress on the immune system of seabirds. *ICES J Mar Sci.* 1997;54:718–725.
- Burger J., Tsipoura A. Experimental oiling of sanderlings (*Calidris alba*): Behavior and weight changes. *Environ Toxicol Chem.* 1998;17(6):1154-1158.
- Campbell T.W. *Avian Hematology and Cytology.* 2nd ed. Iowa: Iowa State University Press, 1995.
- Camphuysen C.J. Methods for Assessing Seabird Vulnerability to Oil Pollution. Workshop documents in: The impact of oil spills on seabirds; 2006 Sep 7-9; Santa Cruz (A Coruña), Spain.
- Clark P., Boardman W., Raidal S. *Atlas of Clinical Avian Hematology.* Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
- Clark R.B. Impact of oil pollution on seabirds. *Environ Pollut.* 1984;33(1):1–22.
- Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:627–647.
- Culik B.M., Wilson R.P., Woakes A.T., Sanudo F.W. Oil pollution of Antarctic penguins: Effects on energy, metabolism and physiology. *Marine Poll Bull.* 1991;22(8):388-391.
- Debacker V., Schiettecatte L-S., Jauniaux T., Bouquegneau J-M. Influence of age, sex and body condition on zinc, copper, cadmium and metallothioneins in common guillemots (*Uria aalge*) stranded at the Belgian coast. *Mar Environ Res.* 2001;52:427–444.
- Dunnet G.M. Seabirds and North Sea oil. *Phil. Trans. R Soc Lon B.* 1987;316:513–524.

Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-247.

Food and Agriculture Organization/Styrelsen För Internationellt Utverklingssamarbete (FAO/SIDA). Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 9. Análisis de presencia de metales y organoclorados en los peces. FAO Documento Técnico de Pesca. 1983;212:1-35.

Fowler G., Wingfield J., Boersma P. Hormonal and reproductive effects of low levels of petroleum fouling in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *The Auk*. 1995;112:382-389.

Gandini P., Boersma P.D., Frere E., Gandini M., Holik T., Lichtschein V. Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina. *The Auk*. 1994;111(1):20-27.

Gonzalez F.J., 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res*. 569:101-110.

Harris E. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. *Nutr Rev*. 2001;59:281-285. Hawkey C.M., Horsley D.T., Keymer I.F.

Haematology of wild penguins (Sphenisciformes) in the Falkland Islands. *Avian Pathol*. 1989;18(3):495-502.

Holm L., Berg C., Brunström B., Ridderstrale Y., Brandt I. Disrupted carbonic anhydrase distribution in the avian shell gland following in ovo exposure to estrogen. *Arch Toxicol*. 2001;75:362-368.

International Union of Conservation of Nature (IUCN). Red List of Threatened Species [online]. [Actualized on March 2014; Downloaded on 28 April 2015]. Available in: <http://www.iucnredlist.org/>.

Jackson J.M., Blaine D., Powell-Tuck J. Korbonits M., Carey A., Elia M. Macro- and micronutrient losses and nutritional status resulting from 44 days of total fasting in a non-obese man. *Nutrition*. 2002;22:889-897.

Janero D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(6):515-40.

Jenssen B.M. Review article: effects of oil pollution, chemically treated oil, and cleaning on the thermal balance of birds. *Environ Poll*. 1994;86:207-215.

Klaassen C. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th ed. Nueva York: McGraw-Hill Professional, 2001.

Kondoh M., Kamada K., Kuronaga M., Higashimoto M., Takiguchi M., Watanabe Y., Sato M. Antioxidant property of metallothionein in fasted mice. *Toxicol Lett*. 2003;143:301-306.

Kosugi H., Kojima T., Kikugawa K. Characteristic of the thiobarbituric acids reactivity of oxidized fats and oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1991;68:51-55.

Leighton F. Clinical, gross, and histological findings in Herring gulls and Atlantic puffins that ingested Prudhoe Bay crude oil. *Vet Pathol*. 1986;23:254-263.

Leighton F. The toxicity of petroleum oils to birds. *Environ Rev*. 1993;1(2):92-103.

Lindgard K., Stokkan K. A., Le Maho Y., Groscolas R. Protein utilization during starvation in fat and lean Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *Comp Biochem Physiol B*. 1992;162:607-613.

Liu J., Yeo H.C., Daniger S.J., Ames B.N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. *Anal Biochem*. 1997;245:161-166.

Ma J., Betts N. Zinc and copper intakes and their major food sources for older adults in the 1994-96 Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII). *J Nutr*. 2000;130:2838-2843.

Mangel M., Munch S.B. A life-history perspective on short-and long-term consequences of compensatory growth. *Amer Nat*. 2005;166:E155-E176.

- Merino S., Barbosa A. Haematocrit values in chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*): variation with age and reproductive status. *Pol Biol.* 1997;17:14-16.
- Monaghan P., Metcalfe N.B., Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett.* 2009;12:75-92.
- Moreno J., Yorio P., García Borboroglu P., Potti J., Villar S. Health state and reproductive output in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Ethol, Ecol Evol.* 2002;14:19-28.
- Mozo J., Emre Y., Bouillaud F., Ricquier D., Criscuolo F. Thermoregulation: What Role for UCPs in Mammals and Birds? *Biosci Rep.* 2005;25(3-4):227-248.
- National Research Council (USNRC). Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects. Washington DC: National Academy Press, 2003.
- Newman S.H., Mazet J.K., Ziccardi M.H., Lieske C.L., Fauquier D.A., Gardner I.A., Zinkl J.G., Christopher M.M. Haematological changes and anaemia associated with captivity and petroleum exposure in seabirds. *Comp Hematol Int.* 1999;9:60-67.
- Nicol S.C., Melrose W., Sahel C.D. Haematology and metabolism of the blood of the little penguin, *Eudyptula minor*. *Comp Biochem Physiol A.* 1988;89(3):383-386.
- Noguera J.C., Kim S.-Y., Velando A. Pre-fledgling oxidative damage predicts recruitment in a long-lived bird. *Biol Lett.* 2011;8:61-63.
- Oakes K., Van del Kraak G. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol.* 2003;63:447-463.
- Parkin G. Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. *Chem Rev.* 2004;104(2):699-768.
- Pérez C., Lores M., Velado A. Oil pollution increases plasma antioxidants but reduces coloration in a seabird. *Oecologia.* 2010;163:875-884.
- Piatt J.F., Lensink C.K., Butler S.W., Kendziorrek M., Nysewander D.K. Immediate impact of the "Exxon Valdez" oil spill on marine birds. *The Auk.* 1990;107:387-397.
- Prior R., Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1173-1181.
- Pütz K., Ingham R.J., Smith J.G. Satellite tracking of the winter migration of Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus* breeding in the Falkland Islands. *Ibis* 2000;142:614-622.
- Quillfeldt P., Masello J.F., Möstl E. Blood chemistry in relation to nutrition and ectoparasite load in Wilson's storm petrels *Oceanites oceanicus*. *Pol Biol.* 2004;27:168-176.
- Reish D.J., Oshida P.S., Mearns A.J., Ginn T.C., Buchman M. Effects of pollution on marine organisms. *Wat Environ Res.* 1999;71(5):1100-1115.
- Richards M.P., Rosebrough R.W., Steele N.C. Effects of Starvation and Refeeding on Tissue Zinc, Copper and Iron in Turkey Poults. *J. Nutr.* 1987;117:481-489.
- Roesijadi G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp Biochem Physiol C.* 1996;113:117-123.
- Russell M., Holcomb J., Berkner A. 30-Years of Oiled Wildlife Response Statistics. Proceedings of the 7th International Effects of Oil on Wildlife Conference; 2003 Oct 14-16; Hamburg, Germany.
- Sahin K.; Sahin N.; Kucuk O.; Hayirli A., Prasad A. S. Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: A review. *Poult Sci.* 2009;88:2176-2183.
- Sandstead H.H. Zinc interference with copper metabolism. *J Am Med Assoc.* 1978;240:2188-2189.
- Sato M., Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *The Tohoku J Exp Med.* 2002;196(1):9-22.
- Savinov V.M., Gabrielsen G.W., Savinova T.N. Cadmium, zinc, copper, arsenic, selenium and mercury in seabirds from the Barents Sea:

levels, inter-specific and geographical differences. *Sci Total Environ.* 2003;306:133–158.

Stokes D.L., Boersma P.D., Davis L.S. Satellite tracking of Magellanic Penguin migration. *Condor.* 1998;100:376–381.

Stoskopf, M.K., Yarbrough, B.A. and Beall, F.B., 1980. Baseline hematology of the African black-footed penguin. In: Montali R.J., Migaki G., editors. *The Comparative Pathology of Zoo Animals*. Washington: Smithsonian Institution Press; 1980. P. 647-652.

Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, Toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12:1161-1208.

Vallee B. The function of metallothionein. *Neurochem Int.* 1995;27(1):23-33.

Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol.* 2000;46(2):407-17.

Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbrì R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res.* 1997;44(1):69-84.

Villouta G., Hargreaves R., Rtveros V. Haematological and clinical biochemistry findings in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *Avian Pathol.* 1997;26(4):851-858.

Biomarcadores hematológicos del sapo común *Bufo (Rhinella) arenarum* en ecosistemas alterados de la provincia de Córdoba

Hematologic biomarkers of the common toad *Bufo arenarum* in altered ecosystem of Córdoba province

Salinas, Zulma Anahí*; Salas, Nancy Edith; Baraquet; Mariana; Martino, Adolfo Ludovico.

Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina.

*zlm.salinas@gmail.com

Recibido: 30 de mayo de 2014

Aceptado: 25 de octubre de 2014

Resumen. El uso de biomarcadores hematológicos es importante para poder evaluar riesgos ambientales y la exposición a sustancias químicas potencialmente tóxicas y así poder desarrollar medidas que sirvan como señales de alarma temprana en ambientes contaminados. El objetivo de este trabajo fue determinar biomarcadores hematológicos en el sapo común *Bufo (Rhinella) arenarum* que proporcionen información para el diagnóstico de la salud de distintos ecosistemas de la provincia de Córdoba. Un total de 93 individuos adultos de *Bufo (Rhinella) arenarum* fueron capturados en cuatro sitios de la provincia de Córdoba y distintas variables ambientales del agua fueron medidas en cada sitio. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante la punción de la vena angularis. Luego fueron teñidas con la tinción diferencial May Grünwald-Giemsa y fueron observadas mediante microscopio Zeiss Primo Star iLED para realizar el conteo de glóbulos blancos. Las variables ambientales del agua mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones, se registraron valores menores en "Alpa Corral", mientras que "Villa Dálcar" presentó los mayores valores para dichas variables. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre localidades en el recuento de glóbulos blancos (cada 1000 eritrocitos); sin embargo, en "Villa Dálcar" se registraron los ejemplares con mayor cantidad de leucocitos en el conteo de glóbulos blancos ($425,48 \pm 481,34$). Mientras que para la fórmula leucocitaria, los linfocitos fueron las células más abundantes para los ejemplares de todos los sitios; encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre cada localidad y "Alpa Corral". Los ejemplares de "Villa Dálcar" presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación a los monocitos y basófilos, registrándose altos valores para ambas células en los ejemplares de este sitio; mientras que en los ejemplares de "Cultivo" las diferencias se encontraron en eosinófilos y la relación neutrófilos/linfocitos. Estos resultados revelaron que de las cuatro localidades analizadas, "Villa Dálcar" representa la más afectada por las actividades antrópicas. Estas variaciones registradas en los parámetros hematológicos podrían considerarse evidencia de la posible presencia de agentes contaminantes en el lago "Villa Dálcar".

Palabras claves: Biomarcadores; Leucocitos; Vena angularis; *Bufo (Rhinella) arenarum*.

Abstract. Hematologic biomarkers are important to assess the environmental and health risks of exposure to potentially toxic chemicals, and for developing measures that serve as early warning signals in polluted areas. The aim of this study was to determine hematologic biomarkers of common toad *Bufo (Rhinella) arenarum* that provide information for the diagnosis of the health of ecosystems of Córdoba province. A total of 93 adult individuals of *Bufo (Rhinella) arenarum* were collected from four sites of Córdoba Province and hydric environmental variables were measured on each site. Blood samples were obtained by angularis vein puncture, smears of fresh blood were stained with May Grünwald-Giemsa and observed by using a microscope Carl Zeiss Primo Star (Pack 5), for white blood cell count. Water environmental variables showed statistically significant differences among localities, with the lowest values in "Alpa Corral" and highest values in "Villa Dálcar". There were no statistically significant differences among individuals of different sites for white blood cells count. However, individuals from "Villa Dálcar" showed the highest number of white cells (425.48 ± 481.34). In the leukocyte formula, lymphocytes were most abundant white blood cells in individuals from all study sites. The blood parameters of toads from all sites showed statistically significant differences with individuals from "Alpa Corral". "Villa Dálcar" Individuals exhibited significant differences in relation to monocytes and basophils with the highest values for both cell types. "Cultivo" locality showed significant differences for eosinophils and for the relationship neutrophils/lymphocytes. These results revealed that "Villa Dálcar" represent the site most affected by human activities. In particular, changes recorded in hematological parameters could be giving evidence of the possible presence of contaminants in Lake "Villa Dálcar".

Keywords: Biomarkers; Leukocytes; Angularis vein; *Bufo (Rhinella) arenarum*.

Introducción

Las poblaciones de anfibios están disminuyendo en todo el mundo, con un 32 % de especies en peligro de extinción y el 43 % de las especies en riesgo (Stuart y col. 2004). Esta creciente reducción, advertida en las poblaciones de anfibios (Collins y Crump 2009), ha generado en los científicos un interés acerca de las posibles causas de dicho fenómeno (Burkhardt y col. 2003; Blaustein y Dobson 2006; Henle y col. 2008). Entre las cuales se pueden citar, las originadas por factores que actúan de manera global y simultánea como el aumento de la radiación ultravioleta, relacionada a su vez con el adelgazamiento de la capa de ozono, el uso indiscriminado de plaguicidas, los múltiples y complejos procesos que resultan en el cambio climático, etc. (Lavilla 2001; Lavilla y Heatwhole 2010). Sin embargo, las declinaciones poblacionales en anuros son el resultado de la acción sinérgica de diversos factores, no solamente a escala mundial sino también algunos a nivel local, como la contaminación del agua, fragmentación de hábitats naturales, etc. (Ross y Stephen 1999; Branch y Hokit 2000; Lavilla 2001; Belden y Blaustein 2002; Blaustein y Kiesecker 2002; Blaustein y Belden 2003).

La pérdida de hábitats originales que sufren estas especies parece ser el factor más importante que lleva a disminución de su tamaño poblacional, así como también, su baja capacidad de recolonizar áreas después de extinciones locales (por presentar baja movilidad y filopatría), agregan más factores a la declinación de las poblaciones de anfibios (Blaustein y col. 1994; Alford y Richards 1999; Houlahan y col. 2000; Kiesecker y col. 2001), lo cual indica que cada vez resulta más esencial incrementar el conocimiento de la diversidad de anfibios y generar la información de base para avanzar en acciones específicas de conservación (Vaira y col. 2012).

Sin embargo, muchas veces estas medidas se encuentran limitadas por la falta de conocimiento sobre las especies y su distribución, asignando un gran número de ellas a la categoría "insuficientemente conocida" (Úbeda y Grigera 2003; Sanabria y Quiroga 2009).

En este contexto, varios trabajos indican que la pérdida de hábitat como resultado del desarrollo de la agricultura puede contribuir a la regresión de la diversidad de anfibios anuros en algunos lugares debido al mayor laboreo de los suelos y la consiguiente pérdida de ma-

teria orgánica, aumento de la compactación, disminución de la capacidad de retención por pastoreo del ganado, erosión de cabeceras de cuencas, y aumentos de contaminación química por plaguicidas y fertilizantes (di Tada y col. 1996; Wake 1998; Lavilla 2001; Davidson y col. 2002; Lajmanovich y col. 2002, 2003; Stuart y col. 2004; Beebee y Griffiths 2005; Peltzer y col. 2006; Stuart y col. 2008; Collins y Crump 2009; Bionda y col. 2012).

En Argentina, la expansión de los sistemas agrícolas modernos y la urbanización extrema, ha simplificado el paisaje (McLaughlin y Mineau 1995) además de liberar una amplia gama de pesticidas que se utilizan comúnmente, afectando la biodiversidad de los anfibios anuros (Alford y col. 2001; Kiesecker y col. 2001; Christin y col. 2003; Cabagna y col. 2005; De Sá 2005).

Los anfibios anuros, representan un grupo particularmente sensible a contaminantes ambientales debido a su doble ciclo de vida (acuático y terrestre) y su piel muy permeable que intercambia materiales con el medio (Welsh y Ollivier 1998; Manzanilla y Péfaur 2000; Cabagna y col. 2005; Lascano y col. 2009; Blaustein y col. 2011) por lo que resultan ser buenos bioindicadores de la salud ambiental (Young y col. 2004).

Los cambios en los parámetros sanguíneos pueden ser útiles en algunas especies como marcadores bioquímicos de la toxicidad de ciertos productos químicos (Haratym-Maj 2002).

Entre los anfibios anuros, el recuento diferencial de glóbulos blancos representa una alerta temprana de exposición a distintos agentes contaminantes antes de que puedan ser detectadas respuestas a nivel de comunidad y ecosistema (Peri y col. 1998; Davis y col. 2004).

El objetivo de este trabajo fue determinar biomarcadores hematológicos del sapo común *Bufo (Rhinella) arenarum* que proporcionen información para el diagnóstico de la salud de los distintos ecosistemas de la provincia de Córdoba.

Materiales y métodos

Se escogieron cuatro sitios, tres de ellos constituyen ambientes urbanos y periurbanos con distintos tipos y grados de alteración ambiental. La importancia en la selección de dichos ambientes para el presente estudio, se basa en los antecedentes de estudios previos so-

bre modificaciones en los parámetros poblacionales en distintas especies de anfibios, así como cambios en las propiedades de las comunidades, posiblemente por el grado de alteración ambiental (Bionda y col. 2011a, 2011b; Bionda y col. 2012a, 2012b; Pollo y col. 2012; Bionda y col. 2013). El primer sitio de estudio corresponde al Río Barrancas ("Alpa Corral", 32° 42' S 64° 42' O; 880 msnm) considerado como el sitio de menor grado de alteración. La elección de dicho sitio se debió a que el Río Barrancas pasa por la localidad serrana de "Alpa Corral", donde por tratarse de un lugar turístico, existen distintas políticas de conservación del ambiente con fines de preservar las condiciones naturales autóctonas del lugar. Otro aspecto a tener en cuenta es el hecho de que los efluentes cloacales no se destinan al río, sino a pozos ciegos y además, actividades antrópicas como la agricultura y ganadería se encuentran alejadas de dicho sitio. El segundo sitio pertenece al sistema de charcas, ubicado en el Campus de la Universidad Nacional de Río Cuarto, ("Charco de las Brujas", 33° 10' S- 64° 20' O; 420 msnm). El tercer sitio fue el lago artificial "Villa Dálcar", ubicado dentro del ejido urbano de la ciudad de Río Cuarto (33° 07' S, 64° 20' O; 438 msnm), y por último, el sitio llamado "Cultivo", que posee una pequeña charca ubicada en un área de cultivo de 9 ha de superficie en cercanías a la ciudad de Río Cuarto (33° 05' S, 64° 26' O; 467 msnm).

Los ejemplares de *Bufo (Rhinella) arenarum* (Pyron y Weins 2011) fueron colectados entre los años 2010 y 2011 durante los meses de septiembre y octubre, coincidiendo con el período reproductivo de la especie. *In situ* se registraron las siguientes variables ambientales del agua: pH, temperatura, conductividad, solutos disueltos totales y salinidad con equipo digital 35-Series Tests™ Multiparámetro 35.425-10.

Luego se procedió a la extracción de sangre mediante la punción de la *vena angularis* (Nöller 1959). Esta metodología, contraria a la extracción de sangre mediante punción cardíaca, elimina por completo la probabilidad de muerte del individuo contribuyendo así a la conservación de la especie.

Se realizaron frotis sobre portaobjetos, dejándolos secar a temperatura ambiente, para luego ser teñidos con tinción diferencial May Grünwald-Giemsa. Inmediatamente después de la extracción los animales fueron restituidos al sitio donde fueron capturados. Los prepara-

dos se observaron con microscopio Zeiss Primo Star iLED a 40X para realizar la descripción de leucocitos (Linfocitos, Monocitos, Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos), considerando las características morfológicas de acuerdo a Hadji-Azimi y col. (1987); Coppo (2003) y Jill Heatley y Johnson (2009).

Se calculó el número total de leucocitos en relación a 10.000 células rojas (eritrocitos) en base a la metodología usada por Davis y col. (2004). Se determinó el índice neutrófilos/linfocitos (N/L), propuesto como medida de los individuos en repuesta al estrés (Davis y col. 2008) y el índice de lobularidad (IL=número de lóbulos contados/número de neutrófilos contados) para evaluar el grado de madurez leucocitaria (García y col. 1997). Además, se realizó un recuento de neutrófilos con núcleos ahorquillados de acuerdo a Davis y col. (2004, 2008).

Para el tratamiento de los datos, se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.0. Se probó la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Luego se realizaron análisis de ANOVA, con aquellas variables donde se encontró normalidad y el análisis de Kruskal-Wallis, para las variables que no presentaron una distribución normal, para evaluar diferencias entre sexos. Para la comparación del sitio control y los otros sitios se llevó a cabo el Test Mann-Whitney.

Resultados

De todas las variables ambientales analizadas, la salinidad, conductividad y sólidos totales del agua presentaron valores inferiores en "Alpa Corral" con respecto al resto de los sitios estudiados; mientras que "Villa Dálcar" fue el sitio que presentó mayores valores (Figura 1). Los valores de pH del agua también fueron altos en "Villa Dálcar", de aproximadamente 9,775 con respecto al resto de los sitios. "Cultivo" con valores de 9,000, "Alpa Corral" de 8,805 y "Charco de las Brujas" de 7,955.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA y Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) entre machos y hembras en el total de leucocitos, ni en la fórmula leucocitaria, por lo que los datos se analizaron sin diferenciación por sexo.

En la Tabla 1 se presentan los datos del total de leucocitos para los sapos de cada sitio de estudio. En la misma se observa que los sapos de "Villa Dálcar" presentaron el mayor promedio de leucocitos ($425,48 \pm 481,34$) con

respecto a los sapos del resto de los sitios. Sin embargo, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores hallados en cada uno de los sitios y en “Alpa Corral” (Test Mann-Whitney: “Villa Dálcar”, $p = 0,783$, $W = 218$; “Charco de las Brujas”, $p = 0,999$, $W = 189,5$; “Cultivo”, $p = 0,936$, $W = 114,5$).

Los porcentajes de cada una de las células de la fórmula leucocitaria para los ejemplares de cada sitio de estudio se muestran en la *Tabla 2*. El índice N/L resultó de $0,321 \pm 0,307$ para los ejemplares de “Alpa Corral”; $0,216 \pm 0,207$ para los de “Charco de las Brujas”; $0,286 \pm 0,308$ para los de “Villa Dálcar” y $0,097 \pm 0,058$ para los de “Cultivo”.

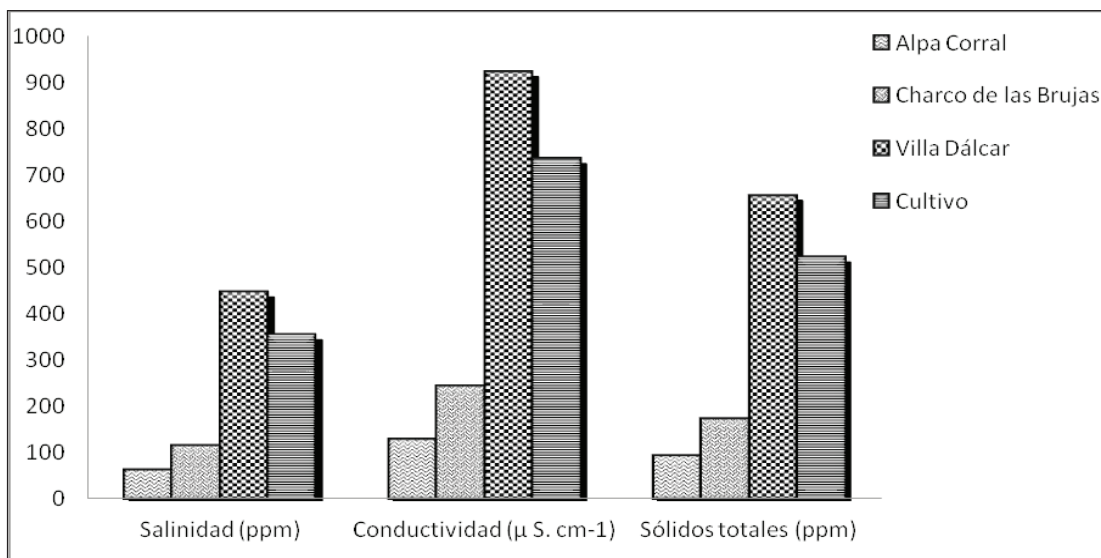


Figura 1. Gráfico de salinidad, conductividad y sólidos totales para cada uno de los sitios de muestreo.

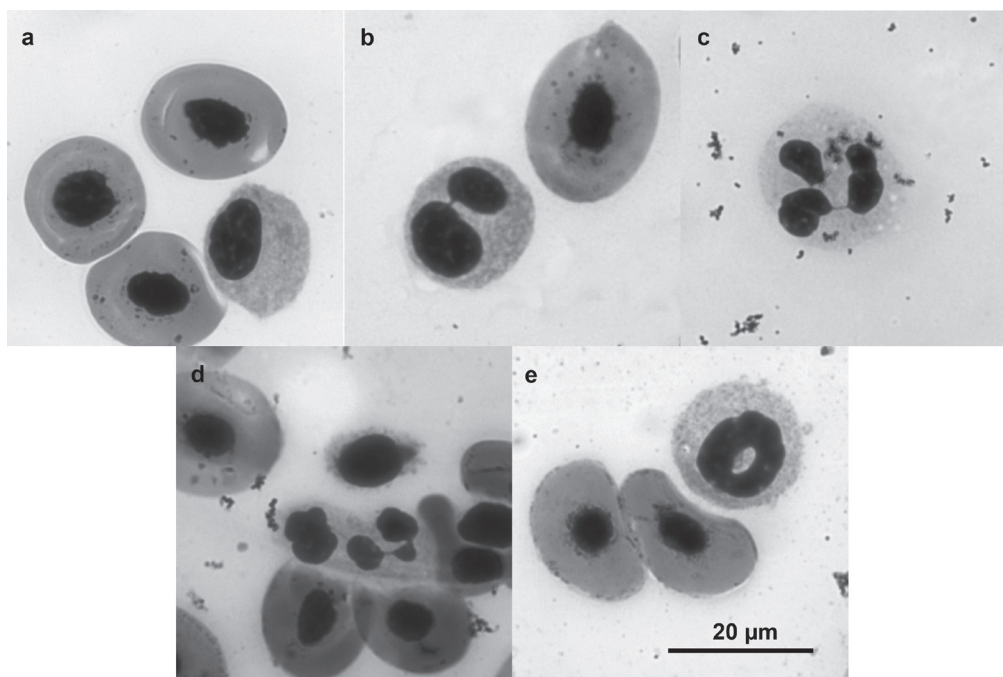


Figura 2. a) Neutrófilo unilobulado, b) neutrófilo bilobulado con característico puente de unión entre los lóbulos, c) neutrófilo trilobulado, d) neutrófilo tetralobulado y e) neutrófilo con núcleo ahorquillado.

Tabla 1. Promedios, desvíos y rangos del conteo de glóbulos blancos/10000 eritrocitos para cada sitio de estudio.

SITIOS	$\bar{x} \pm DE$	Rango
Alpa Corral	351,0 \pm 230,9	15-916
Charco de las Brujas	345,24 \pm 203,39	14-731
Villa Dálcar	425,48\pm481,34	82-2418
Cultivo	345,7 \pm 208,6	83-795

En la comparación de los tres sitios de estudio con "Alpa Corral", se observaron diferencias estadísticamente significativas con las muestras de los animales de "Cultivo" para los eosinófilos y el índice N/L ($p = 0,021$, $W = 175$; $p = 0,014$, $W = 179$); y con los ejemplares de "Villa Dálcar" para basófilos y monocitos ($p = 0,007$, $W = 103,5$; $p = 0,001$, $W = 62,5$).

En este estudio se registraron distintos tipos de lobularidad para los neutrófilos: unilobulado, bilobulado, trilobulado, tetralobulado y con núcleo ahorquillado (*Figura 2*); pudiendo observarse también en baja proporción formas pentalobuladas.

Para la comparación entre sitios, respecto al índice de lobularidad, los ejemplares de "Charco de las Brujas" y "Cultivo" tienen valores similares entre sí (1,86 y 1,83, respectivamente) mayores a los valores que presentan los ejemplares de "Alpa Corral" y "Villa Dálcar" (1,48 y 1,46, respectivamente). "Villa Dálcar" representó el sitio con ejemplares de mayor cantidad

de núcleos ahorquillados (6 núcleos) respecto al total de neutrófilos; para los ejemplares de "Cultivo", 5 núcleos ahorquillados; y para los de "Charco de las Brujas" y "Alpa Corral" 3.

Discusión

Los estudios realizados sobre los parámetros hematológicos de anfibios se han intensificado en las últimas décadas debido a su capacidad para determinar la calidad de un ambiente. Dichos parámetros hematológicos registran cambios a nivel molecular y celular de organización biológica (interacción inicial de los contaminantes con el organismo) y en base a los cuales podemos desarrollar medidas que sirvan como señales de alarma temprana para los niveles de organización superior (Bucheli y Fent 1995; Cajaraville y col. 2000).

En lo que respecta a las variables ambientales, los valores de pH para "Charco de las Brujas" y "Alpa Corral" se encuentran aproximadamente dentro del rango óptimo (entre 6,5 a 8,5) de agua dulce para la sobrevida y fisiología en la mayoría de los organismos acuáticos; mientras que para los sitios "Cultivo" y "Villa Dálcar", los valores resultan muy alcalinos. Fuera del rango antes mencionado, los efectos tóxicos directos pueden ocurrir y los niveles de estrés serán altos (Addy y col. 2004). En anfibios, los valores límites de pH para el desarrollo normal se consideran un poco más acotados, en algunas especies se ha mencionado un límite inferior de 6,3 y superior de 7,7 (García y Fontúrbel 2003).

Tabla 2. Promedios, desvíos, rango y porcentajes de la fórmula leucocitaria para cada sitio. (L=Linfocitos, N=Neutrófilos, E=Eosinófilos, B=Basófilos, M=Monocitos)

	Alpa Corral	Charco de las Brujas	Villa Dálcar	Cultivo
$\bar{x} \pm DE$	511,17 \pm 383,37	653,81 \pm 467,75	585,48 \pm 456,31	473,23 \pm 347,29
L Rango	9-1269	11-1684	33-1744	61-1135
%	76,10	77,65	68,00	84,73
$\bar{x} \pm DE$	103,11 \pm 103,51	119,95 \pm 123,42	130,65 \pm 128,38	50,31 \pm 54,34
N Rango	6-396	1-493	10-482	5-190
%	15,35	14,25	15,17	9,01
$\bar{x} \pm DE$	35,56 \pm 33,06	36,19 \pm 66,76	80,91 \pm 128,00	11,46 \pm 13,33
E Rango	0-122	1-304	1-427	1-48
%	5,29	4,23	9,40	2,05
$\bar{x} \pm DE$	10,22 \pm 9,91	16,67 \pm 14,67	19,22 \pm 12,11	14,15 \pm 9,94
B Rango	0-36	0-43	3-45	2-37
%	1,52	1,98	2,23	2,53
$\bar{x} \pm DE$	11,67 \pm 8,56	15,38 \pm 12,78	44,74 \pm 32,72	9,38 \pm 8,70
M Rango	0-29	0-40	2-118	0-27
%	1,74	1,83	5,20	1,68

La conductividad, por otro lado, es un parámetro relacionado a los Sólidos Totales. En general, a medida que los Sólidos Totales y la conductividad se incrementan, aumenta la Salinidad. De acuerdo a la OMS, la CEE (Comunidad Económica Europea) establece para la conductividad un valor guía para el agua potable de 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (OMS 2004). Esto indica que los sitios "Charco de las Brujas" y "Alpa Corral" presentan valores admitidos, mientras que "Cultivo" y "Villa Dálcar" presentan valores mayores.

Al igual que la mayoría de los trabajos relacionados a hematología sanguínea, no se registraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al sexo (Atatür y col. 1999; Sevinc y Ugurtas 2001; Arserim y Member 2008; Davis y Durso 2009; Arikan y col. 2010; Cabagna y col. 2011). En cuanto al conteo de glóbulos blancos, si bien no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos sitios de estudio y "Alpa Corral", el elevado número de leucocitos (leucocitosis) en los individuos de "Villa Dálcar", podría estar relacionado con el transporte de sustancias por escorrentías de las zonas aledañas que ingresan al lago (Pollo y col. 2012).

La fórmula leucocitaria para *Bufo (Rhinella) arenarum* en este estudio fue similar a la publicada en otros trabajos (Varela y Sellares 1937; Peri y col. 1998; Rosenberg y col. 2003; Cabagna y col. 2005; Chiesa y col. 2006). Siendo la fórmula leucocitaria de los individuos de "Alpa Corral" la que más se asemeja a los valores considerados como basales o normales para la especie (Varela y Sellares 1937). No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos para cada tipo de células en relación al conteo diferencial de glóbulos blancos al igual que lo observado en otros trabajos (Davis y col. 2004; Cabagna y col. 2005; Zhelev 2007; Cabagna y col. 2011).

Los linfocitos fueron los leucocitos más abundantes, sin embargo, una marcada disminución en el número de los mismos (linfopenia) se registró en las muestras de animales provenientes de "Villa Dálcar" donde, esta combinación con el aumento en el número de neutrófilos (neutrofilia), puede ser interpretada como signo de estrés (Davis y Durso 2009). Asociado a esto, las muestras de "Cultivo" presentaron la menor neutropenia.

Se ha demostrado que la exposición a plaguicidas provoca alteraciones en la función inmune de los anfibios llevando a los individuos a

estar más vulnerables a las infecciones bacterianas y fúngicas (Carey y col. 1999; Gilbertson y col. 2003; Cabagna y col. 2005; Arikan 2010). Las elevadas proporciones de monocitos y basófilos encontradas en los individuos de "Villa Dálcar" respecto a los de "Alpa Corral" puede deberse a una respuesta a infecciones bacterianas y a otros patógenos, así como también al estrés (Turner 1988; Campbell 1996; Nava y col. 2001; Davis y col. 2004). De acuerdo a Zhelev (2007), una exposición a largo plazo de contaminantes produce necrosis que genera una mayor cantidad de desechos tisulares. Consecuencia de esto, aumenta en el organismo la cantidad de monocitos en el torrente sanguíneo con un incremento en la fagocitosis para eliminar dichos desechos. Mientras que no está claro el papel de los basófilos en el sistema inmune de los anfibios, por razones desconocidas su número varía en gran medida entre las especies de anfibios en todo el mundo, desde el 57 % en el tritón japonés *Cynops pyrrhogaster* (Pfeiffer y col. 1990) hasta el 1 % en *Bufo alvarius* (Cannon y Cannon 1979).

Los individuos de "Cultivo" presentaron el menor porcentaje de eosinófilos respecto a los ejemplares de los otros sitios, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los de "Alpa Corral". Los eosinófilos, se piensa que están involucrados en la respuesta inmune ante parásitos, siendo en los anfibios la mejor evidencia de esto (Turner 1988; Kiesecker 2002; Thrall 2004). Cuando no existen elevadas cantidades de parásitos para una determinada especie, los eosinófilos también pueden actuar para prevenir infecciones, al igual que como medidas de estrés (Hills y col. 1948; Gordon 1955; Cardinet y col. 1964). Trabajos como el de Cabagna y col. (2005), registran una disminución en el número de eosinófilos en sitios donde se practica cultivo intensivo con soja transgénica; al igual que Kiesecker (2002) quién también registra una supresión del número de eosinófilos por un pesticida, causando un aumento en la susceptibilidad de una especie de rana a infecciones generadas por trematodos.

Los valores de N/L bajos para los individuos de "Cultivo" pueden indicar inmunodepresión (Harmon 1998). En los restantes sitios, a pesar de no presentar diferencias significativas respecto a "Alpa Corral", presentaron valores altos de N/L comparados con "Cultivo". Esto puede deberse a la manipulación de los individuos, que provoca la liberación de una gran

cantidad de hormonas como producto del estrés. Dichas hormonas, como la corticosterona, se sabe varían considerablemente los valores de N/L (Davis y col. 2004, 2008). Otra causa, se relaciona con el periodo reproductivo de la especie, momento altamente estresante para los anfibios (Davis y Maerz 2008b).

Con los aportes realizados por el presente estudio, podemos indicar que "Villa Dálcar" y "Cultivo" representarían los sitios más alterados por las actividades antrópicas. Varios estudios se han realizado en el lago "Villa Dálcar", relacionados con la muerte masiva de peces (Mancini y col. 2000), el crecimiento de algas (Novoa y col. 2011), registros de altas frecuencias de micronúcleos y anormalidades nucleares en peces (Pollo y col. 2012) y altas tasas de anormalidades morfológicas en *Bufo (Rhinella) arenarum* (Bionda y col. 2012) lo que estaría demostrando el grado de contaminación que este sitio ha sufrido en los últimos años.

El número de glóbulos blancos en la especie *Bufo (Rhinella) arenarum* parece ser un buen biomarcador hematológico para ambientes contaminados. Además, esta especie por presentar una amplia distribución y por lo tanto registrarse en una amplia variedad de ambientes, brinda una herramienta muy eficiente para la medición de la calidad de distintos ambientes.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con el financiamiento del programa PPI 18/C350 de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) de la Universidad Nacional de Río Cuarto; Beca de Ayudantía de Investigación Nuevas Tradicionales otorgada por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Resolución n° 302); y Beca Estímulo a las Vocaciones Científicas otorgada por la Secretaría de Ciencia, Técnica y Arte (Resolución n° 160).

Bibliografía citada

Addy K., Green L., Herron E. pH and Alkalinity. URI Watershed Watch. URIWW-3. 2004.

Alford R., Richards S. Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology Annu Rev Ecol Syst. 1999;30:133-165.

Alford R.A., Dixon P.M., Pechmann J.H. Global amphibian population declines. Nature. 2001; 414: 449-500.

Arikan H. A study on the blood cells of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. (Anura: Bombinatoridae). Animal Biol. 2010;60:61-68.

Arserim S.K. y Member A. Hematology of the Uludağ Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludağ National Park (Bursa, Turkey). J of Fisheries & Aquatic Scs. 2008;25:39-46.

Atatür M.K., Arikan H., Çevik I.E. Erythrocyte Sizes of Some Anurans From Turkey. Tr J of Zoology. 1999;23:111-114.

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

Belden L.K., Blaustein A.R. Population differences in sensitivity to UV-B radiation for larval long-toed salamanders. Ecology. 2002;83 (6):1586-1590.

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

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

Bionda C.L., Salas N.E., Caraffa E., Baraquet M., Martino A.L. On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from central Argentina. Herpetology Notes 2012a;5:237-241.

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

Bionda C., Lajmanovich R., Salas N., Martino A., di Tada I. Demografía poblacional en *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) y *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leiuperidae) en agroecosistemas de la provincia de Córdoba, Argentina. Rev Biol Trop. 2013;61(3):1389-1400.

Blaustein A.R., Belden L. K. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. Evol Dev. 2003;5(1):89-97.

- Blaustein A.R., Kiesecker J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol Lett.* 2002;5:597-608.
- Blaustein A.R., Wake D.B., Sousa W. Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence & Susceptibility of Populations to Local & Global Extinctions. *Conserv Biol.* 1994;8:60-71.
- Blaunstein A.R., Dobson A. Extinctions: A message from the frogs. *Nature.* 2006;439:143-144.
- Blaunstein A.R., Han B., Relyea R., Johnson P., Buck J., Gervasi S., Kats L. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 2011;1223:108-119.
- Branch L.C., Hokit D.G. Florida Scrub Lizard (*Sceloporus woodi*). University of Florida, Extension WEC. 2000;139:1-3.
- Bucheli T., Fent K. Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 1995; 25: 201-268.
- Burkhart J.G., Bidwell J.R., Fort D.J., Sheffield S.R. "Chemical stressors," En: Linder G., Krest S.K., Sparling D.W., editores. *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressors.* Pensacola, Florida: SETAC Press; 2003. p. 111-128.
- Cabagna M.C., Lajmanovich R.C., Stringhini G., Sánchez-Hernández J.C., Peltzer P.M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina *Applied Herpetol.* 2005;2:373-380.
- Cabagna M.C., Lajmanovich R.C., Attedemo A.M., Peltzer P.M., Junges C.M., Biancucci G.F., Bassó A. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev Biol Tropical.* 2011;59(1):17-28.
- Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. En: *Science of the Total Environment. Special issue on towards an integrative approach in Environmental Contamination and Toxicology.* MP Cajaraville., editores. Elsevier Science, Oxford; 2000. 247. p. 295-311.
- Campbell T.W. Clinical pathology. En: Mader D.R. editores. *Reptile Medicine and Surgery.* W.B. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Saunders Company; 1996. p. 248-257.
- Cannon M.S., Cannon A.M. The blood leukocytes of *Bufo alvarius*: a light, phase-contrast, and histochemical study. *Can J Zool.* 1979;57:314-322.
- Carey C., Cohen N., Rollins-Smith L. Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev Comp Immunol.* 1999; 23: 459-472.
- Cardinet G.H., Littrell J.F., Schalm O.W. Effects of sustained muscular activity upon blood morphology of the horse. *The California Veterinarian.* 1964;18:31-35.
- Chiesa M.E., Rosenberg C.E., Fink N.E., Saliabán A. Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2006;50:384-391.
- Christin M.S., Gendron A.D., Brousseau P., Manard L., Marcogliese D.J., Ruby D.S., Fournier M. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environ Toxicol Chem.* 2003;22:1127-1133.
- Collins J.P., Crump M. *Extinction in Our Time.* Oxford University Press: New York. 2009.
- Coppo J.A. El medio interno de la "rana toro" (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). Revisión bibliográfica. *Rev Vet.* 2003;14:1.
- Davidson C., Shaffer H.B., Jennings M.R. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conserv Biol.* 2002;16:1588-1601.
- Davis A.K., Cook K.C., Altizer S. Leukocyte Profiles in Wild House Finches with and without Mycoplasmal Conjunctivitis, a Re-

cently Emerged Bacterial Disease. EcoHealth. 2004;1:362-373.

Davis A.K., Maerz J.C. Comparison of Hematological Stress Indicators in Recently Captured and Captive Paedomorphic Mole Salamanders, *Ambystoma talpoideum*. Copeia. 2008b;3:613-617.

Davis A.K., Maney D.L., Maerz, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Funct. Ecol. 2008;22:760-772.

Davis A.K., Durso A.M. White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. Herpetologica. 2009;65(3):260-267.

di Tada I.E., Zavattieri M.V., Bridarolli M.E., Salas N.E., Martino A.L. Anfibios Anuros de la provincia de Córdoba. En: di Tada I.E., Bucher E.H., editores. Biodiversidad de la provincia de Córdoba. Córdoba, UNRC: Fauna; 1996. p. 191-215.

De Sá R.O. Crisis Global de Biodiversidad: Importancia de la Diversidad Genética y la Extinción de Anfibios. Agrociencia. 2005;9(1-2):513- 522.

García G., Fontúrbel F. Propuestas para un desarrollo sostenible. Lago Titikaka por estrategia K. Ed. Publicaciones Integrales. La Paz; 2003. p. 105.

García B., Rubio F., Carrasco M. Hematología 1. Citología, fisiología y Patología de hematíes y leucocitos. Paraninfo, Madrid, España, 1997.

Gilbertson M.K., Haffner G., Rouillard G.D., Albert A., Dixon B. Immuno-suppression in the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Induced by Pesticide Exposure. Environ. Toxicol. Chem. 2003;22:101-110.

Gordon A.S. Some aspects of hormonal influences upon the leukocytes. Ann.N.Y. Acad. Sci. 1955;59:907-927.

Hadji-Azimi I., Coosemans V., Canicatti C. Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* Hematology. Developmental and comparative immunology. 1987;11:807-874.

Harmon B.G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Poultry Sci. 1998;77:972-977.

Henle K., Alard D., Clitherow P., Cobb L., Firbank T., Kull D., McCracken R.F., Moritz J., Niemela M., Rebane D., Wascher A., Watt, Young J. Identifying and managing the conflicts between agriculture and biodiversity conservation in Europe—a review. Agriculture Ecosystems and Environment. 2008; 124: 60-71.

Hills A.G., Forsham P.H., Finch C.A. Changes in circulating leukocytes induced by the administration of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in man. Blood. 1948;3:755-768.

Houlahan J.E., Findlay C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H., Kuzmin, S.L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature. 2000; 404:752-755.

Jill Heatley J., Johnson M. Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide. Topics in Medicine and Surgery. J. of Exotic Pet Med. 2009;18(1):14-19.

Kiesecker J.M., Blaustein A.R., Belden L. Complex causes of amphibian population declines. Nature. 2001;410:681-684.

Kiesecker J.M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian deformities in nature? Proc of the Nat Ac of Sc. 2002;99:9900-9904.

Lajmanovich R.C., Lorenzatti E., de la Sierra P., Marino F., Peltzer P.M. First registrations of organochlorines pesticides residues amphibians of the Mesopotamic Region, Argentina. Froglog. 2002;54:4.

Lajmanovich R.C., Sandoval M.T., Peltzer P.M. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations. Bull Environ Contam Toxicol. 2003;70:612-618.

Lascano C., Sotomayor V., Ferrari A., Venturino A. Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. Acta Toxicol Argent. 2009;17:8-19.

- Lavilla E. O. Amenazas, declinaciones poblacionales y extinciones en anfibios argentinos. Cuad Herpetol. 2001;15(1):59-82.
- Lavilla E.O., Heatwole H. Status of Amphibian conservation and decline in Argentina: 30-78. En: Heatwole, H., editores. Amphibian Biology. (9). Status of decline of Amphibians: Western Hemisphere. Part 1. Paraguay, Chile and Argentina. Surrey Beatty & Sons, Australia. Cuad. Herpetol. 2010. p. 59-82.
- Mancini M., Rodriguez C., Finola M., Basualdo C., Prospero C. Mortandad de peces en un lago recreacional del Sur de Córdoba, Argentina. Revista Aquatic. 2000;11:1-7.
- Manzanilla J., Péfaur J. Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. Rev Ecol Lat Am. 2000;7:17-30.
- Mclaughlin A., Mineau P. The impact of agricultural practices on biodiversity. Agric, Eco and Env. 1995;55:201-12.
- Nava M.P., Veiga J.P., Puerta M.L. White blood cell counts in house sparrows (*Passer domesticus*) before and after moult and after testosterone treatment. Canadian J of Zool. 2001;79:145-148.
- Novoa M.D., Luque M.E., Lombardo D.L., Martínez de Fabricius A.L. Distribución temporal del fitoplancton en un lago urbano del centro de Argentina (Río Cuarto, Córdoba). Biológicas. 2011;13(2):1-14.
- Nöller H. G. Eine einfache Technik der Blutentnahme beim Frosch. Pflüger' s Arch of Physiol. 1959;269:98-100.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Guías para la Calidad del Agua Potable. Vol 1: Recomendaciones. 3th ed. [en línea] 2006. Versión electrónica para la Web [Consulta 4 de agosto de 2014]. Disponible en http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/es/.
- Peltzer P.M., Lajmanovich R.C., Attademo A.M., Beltzer A.H. Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. Biodiv and Cons. 2006;15:3499-3513.
- Peri S.I., Fink N.E., Salibián A. Hematological parameters in *Bufo arenarum* injected with sublethal dose of lead acetate. Biomed Environ Sci. 1998;11:70-74.
- Pfeiffer C.J., Pyle H., Asashima M. Blood cell morphology and counts in the Japanese newt (*Cynops pyrrhogaster*). J Zoo. Wildl Med. 1990;21:56-64.
- Pollo F.E., Salas N.E., Mancini M.A., Martino A.L. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. Acta Toxicol Argent. 2012;20(2):62-67.
- Pyron R.A., Wiens J.J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. Mol Phyl and Evol. 2011;61:543-583.
- Rosenberg C.E., Fink N.E., Arrieta M.A., Salibián A. Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of toad (*Bufo arenarum*) neutrophils. Comp. Biochem and Physiol Part. C. 2003;136:225-233.
- Ross A.A., Stephen J.R. Global amphibian declines: A problem in applied ecology. Ann Rev of Ecol and Systematics. 1999;30:133-65.
- Sanabria E.A., Quiroga L.B., Acosta J.C. Sitios de oviposición y esfuerzo reproductivo en *Chaunus arenarum* (Anura: Bufonidae) en el desierto del Monte, Argentina. Rev Esp de Herpetol. 2007;21:49-53.
- Sevinc M., Ugurta I.H. The Morphology and Size of Blood Cells of *Lacerta rudis bithynica*. Asiatic Herpetol Res. 2001;9:122-129.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fishman D.L., Waller R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions. Worldwide Sc. 2004;306:1783-1786.
- Stuart S.N., Hoffmann M., Chanson J.S., Cox N.A., Berridge R.J., Ramani P., Young B.E. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona, Spain; IUCN, Gland, Switzerland; and Conservation International, Arlington, Virginia. 2008.

Thrall M.A. Hematology of amphibians. En: M.A. Thrall, D.C. Baker, and E.D. Lassen, editores. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2004.

Turner R.J. Amphibia. En: Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A., editores. Vertebrate blood cells. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p. 154-160.

Úbeda C., Grigera D. Análisis de la evaluación más reciente del estado de conservación los Anfibios y Reptiles de Argentina. Gayana. 2003;67(1):97-113.

Vaira M., Akmentins M., Attademo M., Baldo D., Barrasso D., Barrionuevo D., Basso N., Blotto B., Cairo S., Cajade R., Céspedes J., Corbalán V., Chilote P., Duré M., Falcione C., Ferraro D., Gutiérrez F.R., Ingaramo M.R., Junges C., Lajmanovich R., Lescano J.N., Marangoni F., Martinazzo L., Marti R., Moreno L., Natale G.S., Pérez Iglesias J.M., Peltzer P., Quiroga L., Rosset S., Sanabria E., Sánchez L.,

Schaefer E., Úbeda C., Zaracho V. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. Cuad Herpetol. 2012;26(Supl. 1):131-159.

Varela M.E., Sellares M.E. Variaciones estacionales del cuadro hemático en el *Bufo arenarum* (Hensel). Rev Soc Arg Biol. 1937;13:412-416.
Wake D.B. Action on amphibians. Trends Ecol Evol. 1998;13:379-380.

Welsh H.H., Ollivier L.M. Jr. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's Redwoods. Ecol Appl. 1998;8:1118-1132.

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

Zhelev Z.M. Investigation on the Blood Differential Formula in *Rana ridibunda* (Anura, Amphibia) from the Area of the Maritsa – Iztok 1 Steam Power Plant. Acta zool bulg. 2007;59(2):181-190.

REVISIONES

Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico

Flavonoids: Chemical composition, medical actions and toxicity

Rodrigues da Silva, Laís¹; Martins, Livia do Vale²; Bantim Felicio Calou, Iana³; Meireles de Deus, Maria do Socorro³; Ferreira, Paulo Miche Pinheiro¹, Peron, Ana Paula^{1*}

¹Universidade 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. ²Bairro Iningá. Universidade Federal do Piauí (UFPI). Campus Ministro Petrônio Portela (CMPP). Centro de Ciências Agrárias (CCA). Teresina, Estado do Piauí. CEP 64049-550. ³Rua Cícero Duarte, 940. Bairro Junco. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB). Núcleo de Pesquisa Aplicada a Saúde e ao Meio-ambiente (NUPB-SAM). Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal, Picos, Estado do Piauí. CEP 64607-670.

*anpapegenpes@hotmail.com

Recibido: 22 de marzo de 2014

Aceptado: 4 de abril de 2015

Resumo. Os flavonóides são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável, e portanto, de considerável interesse científico e terapêutico. Assim, teve-se por objetivo realizar uma revisão bibliográfica, de forma extensa porém objetiva, sobre as principais ações terapêuticas e a toxicidade das principais classes de flavonóides. A partir desta revisão da literatura, verificou-se, em ensaios pré-clínicos, que estes compostos tem o potencial de modificar a biossíntese de eicosanoides (resposta anti-prostanoide e antiinflamatória); de proteger o colesterol-LDL da oxidação (inibindo formação de placa aterosclerótica); de prevenir a agregação plaquetária tendo efeitos anti-trombóticos; de promover o efeito anti-hipertensivo e anti-iscêmico; de regenerar antioxidantes primários, como a vitamina C, no organismo; de ter efeito antipromocionais na carcinogênese de alguns tipos de câncer; de amenizar os sintomas da menopausa; de aumentar a lipólise; de desacelerar o processo degenerativo em bainhas de mielina; de aumentar a secreção de insulina; de aumentar a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas sinápticas; de estimular os linfócitos B a produzirem anticorpos e de possuir atividade leishmanicida. Quanto a toxicidade dos flavonóides, estudos demonstram que em altas doses e em utilização crônica, estes compostos desencadeiam reações alérgicas em humanos; modificam as membranas de hepatócitos causando necrose e morte celular em ratos; causam mutagenicidade e clastogenicidade em medula óssea de camundongos; interferem de forma significativa no funcionamento da tireóide e inibe a ação de citocromos P450 causando alterações drásticas no funcionamento do fígado de roedores. Dessa forma, pode-se verificar que os flavonóides tem uma grande capacidade terapêutica quando bem utilizado, devendo-se sempre levar em consideração doses e tempo de exposição aos organismos aos quais são administrados. Essas considerações são importantes por servirão de base para o estabelecimento de doses seguras e eficazes de utilização dos flavonóides para a população.

Palavras-chave: Compostos flavonóicos; Fármacos naturais; Ações medicinais; Toxicidade

Abstract. Flavonoids are a group of natural substances with variable phenolic structure and therefore, considerable scientific interest and therapeutic. Thus, the objective was to conduct a literature review of but objective extensively on major therapeutic actions and on the toxicity of flavonoids class. In this literature review, it was found that, in preclinical studies, these compounds have the potential to modify the biosynthesis of eicosanoids; protect LDL cholesterol from oxidation; prevent platelet aggregation with antithrombotic effects; promote the antihypertensive and anti-ischemic effect; regenerate primary antioxidants like vitamin C in the body; not to promote some carcinogenic effects on certain types of cancer; alleviate menopausal symptoms; increase lipolysis; slow down degenerative process in myelin sheaths; increase insulin secretion; increase the expression of genes responsible for the production of synaptic proteins; stimulate lymphocytes B to produces antibodies and have leishmanicydal activity. About the toxicity of flavonoids, studies show that, at high doses and in chronic use, these compounds trigger allergic reactions in humans; modify the membranes of hepatocytes, causing necrosis and cell death, in rats; cause mutagenicity and clastogenicity in mouse bone marrow, interfere significantly on thyroid function and inhibit the action of cytochrome P450, causing drastic changes in the function of the liver in rodents. Thus, it can be seen that the flavonoids have a wide therapeutic capacity when properly used, taking into account doses and exposure times to whom they are administered. These considerations are important because they set the bases for the establishment of safe and effective doses of flavonoids on the population.

Keywords: Flavonoid compounds; Natural drugs; Medicinal actions; Toxicity

Introdução

O uso de plantas medicinais tem sido significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial faz uso de plantas na amenização ou cura de doenças (Lima *et al.* 2010). Assim, nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico no entendimento do mecanismo de ação de compostos presentes nas plantas com ações medicinais, como por exemplo, os flavonóides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e lignanas, sendo isto claramente observado pelo número de trabalhos científicos publicados nesta área em congressos e em periódicos científicos nacionais e internacionais.

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, e encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos. São pigmentos naturais importantes e nas plantas tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (Lopes *et al.* 2010). Basicamente, todos os flavonóides são constituídos por três anéis, onde os seus carbonos podem sofrer variações químicas, como hidroxilação, hidrogenação metilação e sulfonação, proporcionando a formação de mais de quatro mil compostos flavonóides, que são agrupados em classes (Georgiev *et al.* 2014). Estão diariamente presentes na dieta humana e considerados por especialistas da área da saúde importantes protetores naturais do organismo contra vários efeitos adversos (Ribeiro *et al.*, 2006)

Suas principais classes são as antocianinas, flavanas, flavonas, os flavonóis e isoflavonóides (Lazary 2010). Estas classes polifenólicas, desde a década de 80, se destacam por suas propriedades farmacológicas. Até o momento, em testes com animais, estes compostos demonstram ter ação terapêutica, como por exemplo, aos sistemas imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso (Georgiev *et al.* 2014). No entanto, apesar de Havsteen (2002) afirmar que a toxicidade promovida por flavonóides é rara, e de Ribeiro *et al.* (2006) citar que, salvo em raros casos de alergia, pouca relevância toxicológica é dada ao consumo de flavonóides, estes polifenólicos em doses altas e em uso prolongado ocasionaram toxicidade significativa em mamíferos.

Assim, em função do amplo estudo feito com as classes de flavonóides nos últimos tempos e por não haver na literatura científica uma revisão sistêmica que aborde simultaneamente

o mecanismo de ação medicinal e a toxicidade deste polifenólicos, este estudo teve por objetivo realizar um levantamento bibliográfico, de forma extensa porém objetiva, sobre as principais ações terapêuticas e de toxicidade dos flavonóides.

Metodologia

Para uma completa revisão, somente fontes primárias foram usadas. As bases de dados pesquisadas foram MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), SciELO (Scientific Electronic Library Online), PubMed, Higiwire e Google acadêmico. As informações, disponibilizadas em Inglês ou Português, foram coletadas usando as seguintes palavras-chave: plantas medicinais, flavonóides, ações medicinais, toxicidade. Estipulou-se como período de análise para a seleção dos trabalhos o início da década de 90 até os dias atuais.

Desenvolvimento

Flavonóides: origem, estrutura química e classes

Os flavonóides compõem uma ampla classe de compostos polifenólicos de origem vegetal, cuja síntese não ocorre na espécie humana (Lopes *et al.* 2010). São encontrados nas partes aéreas das plantas de diferentes ecossistemas, com ênfase as angiospermas, e considerados compostos relativamente estáveis por resistirem a oxidação, altas temperaturas e mode-radas variações de acidez. Podem se apresentar como agliconas, glicosídeos ou fazerem parte de outros compostos químicos, como as flavolignanas (Kumar e Pandey 2014). Estes polifenólicos são biossintetizados pela via do ácido chiquímico, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas, que tem por função originar o ácido cinâmico e seus derivados, como os ácidos cafeico, ferúlico e sináptico, com nove átomos de carbonos; e pela via do acetato que origina um tricetídeo com seis átomos de carbonos. A condensação de um dos derivados do ácido cinâmico com o tricetídeo gera um composto com 15 átomos de carbonos formando assim o precursor inicial de todas as classes de flavonóides (Dewik 2010). Assim, a estrutura química básica destes compostos, conhecida como *flavilium*, consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), os benzenos, interligados a uma estrutura heterocíclica

ca central, o pirano (anel C), onde o primeiro benzeno é condensado com o sexto carbono do pirano, que na posição 2 carrega um grupo fenila (Dornas *et al.* 2010), conforme pode ser visualizado na Figura 1.

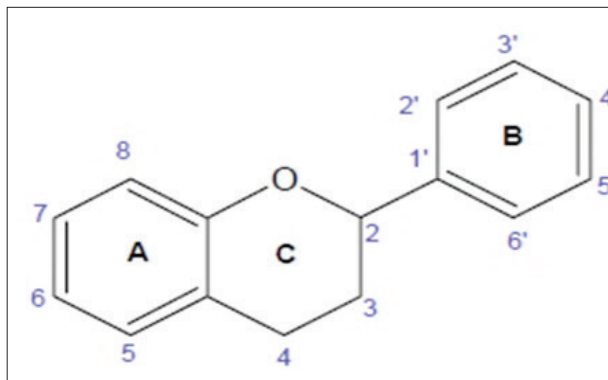


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides.

Fonte: www.google.com.br

De acordo com Machado *et al.* (2008), a grande diversidade estrutural encontrada nos flavonóides ocorre em função das pequenas modificações químicas ocorridas na estrutura básica destes compostos, que podem ser por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidro-genação, malonilações e sul-fatações, condição esta forma as diferentes classes de flavonóides.

As principais classes destes compostos são as Antocianinas, encontradas predominantemente em frutas e flores e tendo como principais representantes a cianidina, delphinidina e a peomidina; as flavanas encontradas em frutas, chás, lúpulo, nozes e água de coco. Seus principais representantes são as catequinas, as epicatequinas, o luteoforol, as proceanidinas e as theaflavinas; as flavonas, encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas e sendo a hesperidina e a naringerina seus principais representantes; os Flavonóis, presentes exclusivamente em frutas e folhas, sendo representados pelas quercetinas, rutinas, micertinas e os camferóis; e os isoflavonóides, que em alguns casos são chamados de isoflavonas, encontrados em legumes, particularmente na soja, e representados principalmente pela daidzeína e genisteína (Lazary 2010).

As isoflavonas podem ocorrer tanto na forma de aglicona como na forma glicosilada, quando possui uma ose de um dos seus anéis benzenos. A forma glicosilada ocorre naturalmente nos grãos da soja e na farinha de

soja; já os acetil-derivados e as agliconas são formados durante o processamento industrial da soja ou no metabolismo da soja no organismo (Lopes *et al.* 2010).

Além das atividades desempenhadas nas plantas, como a pigmentação de frutos e flores, a regulação do crescimento vegetal e a proteção da planta contra agentes oxidativos, ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstraram ampla variedade de atividades biológicas dos compostos flavonóides, com ênfase aos onóides e isoflavonóides. Dessa forma, percebe-se que a pesquisa com flavonóides é motivada por duas questões principais que são a diversidade estrutural muito ampla e o grande espectro de atividades biológicas atribuídas a substâncias pertencentes a este grupo. A cada dia, novos arranjos estruturais são observados e estudados para a verificação de suas atividades biológicas. Assim, é fato que o mecanismo de ação dos flavonóides depende da sua estrutura química. No entanto, as ações realizadas na planta bem como o seu potencial medicinal depende amplamente do sinergismo entre a estrutura química dos flavonóides e as estruturas químicas de outras classes de compostos, como os terpenos. Dessa forma, apesar do amplo estudo já realizado com flavonóides, verifica-se que ainda não está claro o mecanismo entre a atividade medicinal e a sua estrutura química.

Também é importante relatar que as diferenças individuais dentro de cada classe destes compostos resultam na variação e no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificação nos anéis e no grau de metilação e glicosilação. Estas modificações dependem do estágio em que a planta se encontra, se jovem ou adulta, e de quais compostos químicos estão prevalecendo naquele momento. Um dos únicos mecanismos de ação bem estabelecidos e descritos na literatura é a ação oxidativa destes compostos, onde a estrutura básica dos mesmos reage com muitos radicais livres formando complexos estáveis pela conjugação das ligações duplas de suas cadeias carbônicas, porém, certos aspectos biofísicos de seu funcionamento ainda não estejam claros.

Mecanismo de ação de flavonóides com potenciais terapêuticos

Neste tópico será abordado o mecanismo de ação terapêutica dos flavonóides. Todos os relatos descritos comprovando esta ação

foram obtidos a partir de experimentos em laboratórios utilizando, principalmente, roedores como organismos de prova e com doses consideradas ideais de uso pelos pesquisadores para o sistema-teste utilizado. É relevante citar que os estudos avaliando as ações medicinais destes compostos em humanos são escassos, e os que estão relatados na literatura científica são tidos como inconclusivos por muitos especialistas, em função das análises epidemiológicas não terem confirmado a correlação entre o consumo de flavonóides e a melhora da saúde.

Assim, exames laboratoriais e clínicos em organismos-testes demonstram a eficácia dos flavonóides na prevenção de doenças cardiovasculares, cancerígenas, imunológicas, etc. Para a construção deste tópico, muitos artigos foram lidos, todavia, optou-se por colocar apenas as citações bibliográficas atuais em função de que, quase sempre, um trabalho é a comprovação do outro, com a diferença de que os flavonóides testados foram extraídos de plantas diferentes. Estes compostos são estudados desde os anos 80. No entanto, no início da década de 90, com o intenso apelo comercial para o consumo de produtos à base de plantas medicinais, as pesquisas com estes compostos químicos foram intensificadas. Após a consulta às bases de dados MEDLINE, Scielo, PubMed e Google Acadêmico, pode-se observar que do ano 1996 até os dias atuais, em média, 150 trabalhos envolvendo a atividade medicinal destes compostos fenólicos são publicados anualmente.

Dentre os flavonóides com ação medicinal estão os flavonóis, com ênfase as quercetinas e o caempferol, nas concentrações de 0,1; 1,0; 3,0 e 100,0 μM , em tratamento agudo. Estes dois compostos, em ação conjunta, demonstram ter grande potencial anti-inflamatório por modular a ação de componentes celulares envolvidos no mecanismo da inflamação, como por exemplo, a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas pró-inflamatórias como as TNF- α e IL-1, e a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase. Estas ações promovem a agregação de plaquetas e redução à trombose (Queiroz *et al.* 2014; Todorova e Trendafova 2014).

Ainda, as quercetinas mostram, na concentração de 35 mg/Kg em tratamento crônico,

ter ação vasodilatadora por modificar a biosíntese de eicosanóides que é a resposta anti-prostanóide e anti-inflamatória de proteger o colesterol-LDL da oxidação com a função de impedir a formação de placa aterosclerótica, de prevenir a agregação plaquetária e, nas concentrações de 150 mg/Kg em tratamento crônico, de promover efeito anti-hipertensivo e anti-isquêmico (Pirie *et al.* 2014; Sheuder *et al.* 2014). A classe de flavonóis, de maneira geral, também exerce efeito hepatoprotetor ao fígado, protegendo-o contra a falência induzida por isquemia-reperfusão, nas concentrações de 125,0; 250,0 e 500 mg/mL em tratamento por 7 dias (Dong *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013).

Em relação aos isoflavonóides, estudos demonstraram que, nas doses de 1 a 10 μM estes compostos são grandes doadores de elétrons por apresentarem estruturas químicas conjugadas em anel, ricas em grupos hidroxilas, que tem grande ação antioxidante por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singleto, radicais peróxido de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo. A ação desta classe de flavonóides demonstra potencializar a ação de polimerases de revisão diminuindo danos ocasionados ao DNA e inibir a promoção de tumores em vários tipos de câncer iniciados a partir da ação de radicais livres (Yang *et al.* 2013; Yan *et al.* 2014).

Já o isoflavonóide Daidzeína, em várias concentrações diferentes e em tratamento crônico, demonstra atuar como protetor e regenerador dos antioxidantes primários do organismo, como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno (vitamina A) (Brewer *et al.* 2014; Ma 2014). Estes mesmos autores relatam que este polifenólico pode, efetivamente, inibir as reações oxidativas deletérias a tecidos e retardar os fenômenos fisiopatológicos da aterosclerose e da trombogênese. Este composto, 1 a 10 μM , também mostrou ter a propriedade de inibir várias enzimas envolvidas na carcinogênese promovendo efeitos anti-iniciais e antipromocionais na carcinogênese de pele, mama e próstata (Pan *et al.* 2013; Pericleous *et al.* 2014).

Ainda, em muitos estudos observou-se que as isoflavona, consideradas fitoestrógenos, tem efeito benéfico nos distúrbios da pós-menopausa que são caracterizados pela suspensão da função ovariana, declínio da

secreção de estrogênio e alterações histomorfológicas e metabólicas. Assim, estes isoflavonóides demonstram reduzir as manifestações da menopausa como o ressecamento vaginal, a diminuição da libido, ansiedade, dores musculares e das articulações, aumento de temperatura e doenças cardiovasculares (Pericleous *et al.* 2014).

Outros estudos também demonstraram que as isoflavonas agem sobre a espessura do endométrio uterino, o acúmulo de gordura tecidual, o colesterol HDL e a glicose plasmática em animais ovariectomizados, ou seja, é eficiente na diminuição dos estoques de gorduras uterina e retroperitoneal, no aumento de HDL e na redução da glicemia. Dessa forma pode se dizer que estes flavonóides promovem a redução da adiposidade, reduzindo a lipogênese e aumentando a lipólise (Torrezan *et al.* 2008).

É sabido que em função das cadeias cíclicas que compõe os flavonóides estes são pouco solúveis em água, e assim possuem uma tendência a acumular-se em membranas biológicas desacelerando o processo degenerativo da bainha de mielina de neurônios de roedores com doenças neurodegenerativas. Também podem interagir com diferentes receptores e transdutores de sinal influenciando no funcionamento da célula por meio da modulação no comportamento das camadas lipídica presentes em suas membranas (Takahovsky *et al.* 2014).

Os flavonóis, as antocianidinas e as isoflavonas também exercem efeito benéficos no tratamento da diabetes por aumentar a secreção de insulina, diminuindo a apoptose e promover a proliferação de células β -pancreáticas. Também regulam o metabolismo da glicose em hepatócitos, reduzem a resistência à insulina, à inflamação e estresse oxidativo em tecidos musculares e adiposo (Babu *et al.* 2013). Outro estudo também evidenciou a ação dos flavonóis no aumento da expressão de genes que produzem proteínas sinápticas auxiliaadoras do impulso elétrico durante as sinapses, demonstrando potencial no tratamento de doenças como o mal de Parkinson e a depressão (Xu *et al.* 2013).

Oda *et al.* (2011), em um trabalho, demonstraram que os flavonóides tem a propriedade de estimular os linfócitos B a produzirem anticorpos. Estes mesmos autores ainda relatam que estes polifenólicos tem atividade leishmanicida, por causar alterações morfológicas nas

formas promastigotas das *Leishmanias* em geral e melhorar a resposta imunológica frente a estes protozoários, ativando macrófagos.

Apesar da atividade biológica de alguns compostos presentes em plantas com ações medicinais, como os flavonóides, muitos podem ser nocivos ao organismo, ou seja, assim como qualquer fármaco sintético pode ser tóxico, compostos presentes em plantas medicinais também podem causar toxicidade, em nível sistêmicos e celular, dependendo do tempo de utilização e das doses utilizadas. Apesar do grande número de trabalhos sobre as ações terapêuticas das classes flavonóicas percebe-se que muitos dados são semelhantes quando comparado com outros artigos, mudando-se muitas vezes apenas o organismo de prova. Outro problema é a não apresentação clara e objetiva dos resultados obtidos com estes compostos polifenólicos, ocasionando rejeição por parte de outros pesquisadores em utilizá-los como referência ou modelo para a realização de outras pesquisas com estes compostos.

As ações medicinais dos flavonoides são estudadas há quase quatro décadas. No entanto, no início da década de 2000, com o intenso apelo comercial para o consumo de produtos à base de plantas medicinais, as pesquisas com estes compostos foram intensificadas no mundo todo. Em consulta as bases de dados MEDLINE, Scielo e Google acadêmico observa-se que do ano de 2001 ao ano de 2014, em média, 150 trabalhos sobre a atividade medicinal destes compostos polifenólicos são publicados anualmente. Diferentemente, poucos são os trabalhos encontrados na literatura científica sobre a toxicidade dos flavonóides.

Toxicidade dos flavonóides

É de conhecimento que a cura de doenças ou amenização de seus sintomas por meio das plantas sempre foi uma prática comum em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento econômico (Frescura *et al.* 2012). No Brasil, essa prática é amplamente difundida, porém, quase sempre realizada de forma indiscriminada e sem orientação médica (Asare *et al.* 2012). A utilização de plantas medicinais sempre foi marcada pelo apelo comercial de que o “natural” não faz mal. No entanto, muitos componentes com atividades medicinais extraídos de plantas já demonstraram ter ação citotóxica, genotóxica

e/ou mutagênica (Varanda, 2006), condições que podem contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de câncer (Meyer *et al.* 2011).

No caso dos flavonóides, Meotti (2006) relata que estes polifenólicos são fracamente antigênicos, mas cita que reações alérgicas ocorrem em cerca de 3 a 5 % da população após ingerir alimentos com altas concentrações destes compostos. Este autor ainda informa que a dose letal 50 (DL₅₀) de isoflavonas é igual a 2 g/Kg em ratos, quando administradas via intravenosa e em tratamento crônico.

Em outros estudos foi demonstrado que as concentrações elevadas de flavonóides causam alterações morfológicas nas membranas dos hepatócitos de camundongos, promovendo necrose celular e morte do animal (Verma *et al.* 2013) Também foi observado que altas doses destes compostos polifenólicos causam atividade mutagênica as células de medula óssea de ratos Wistar, em função dos radicais epóxidos formados durante a sua biotransformação no trato gastrointestinal destes animais (Porto *et al.* 2013).

Em outras pesquisas foi verificado que a ingestão excessiva e por tempo prolongado de quercetina, podem interferir na função da tireóide, inibindo captação de iodeto. Estes dados foram obtidos em experimento a fim de investigarem os efeitos inibitórios da quercetina na função da tireóide *in vivo* através da avaliação da captação de iodo radioativo em ratos Sprague Dawley (Giuliani *et al.* 2014). Em outro estudo utilizando o teste do Cometa e o teste de Micronúcleos foi verificado danos significativos a estrutura dos cromossomos por meio da ação de flavonóides. Estes mesmos autores ainda relatam que os isoflavonóides em altas concentrações tem o potencial de inibir a ação de citocromos P450 promovendo alteração drásticas no funcionamento do fígado (Silva *et al.* 2013).

Como já mencionado, em busca de trabalhos na literatura, percebeu-se claramente que o número de trabalhos avaliando as ações medicinais dos flavonóides é superior ao número de pesquisas de avaliação da sua toxicidade. Isto é preocupante, em função de que e conforme já relatado, o uso de compostos naturais, principalmente de maneira indiscriminada, causa reações adversas ao organismos. Apesar destes testes sobre as propriedades medicinais dos flavonóides terem sido comprovadas apenas em animais, a mídia audio-

-televisiva, revistas e outros meios de comunicação, consideram que estes compostos tenham a mesma ação em humanos, e ressaltam as propriedades “milagrosas” dos mesmos, não considerando os efeitos tóxicos e as consequências que os mesmos podem causar. Ainda, muitos trabalhos não deixam claro em quais doses e tempo de exposição os flavonóides são tóxicos, o que ocasiona, muitas vezes, o não interesse de outros pesquisadores em utilizá-los como referência ou modelo para a realização de outras pesquisas com estes compostos. Acredita-se que em função disso as classes flavonóicas sejam consideradas na literatura científica e pela mídia em geral isenta de atividade tóxica.

Conclusão

A realização desse trabalho que incluiu os aspectos químico dos flavonoides, seu uso terapêutico e seu potencial de toxicidade a organismo, contribuirá para o conhecimento sobre potencial desses compostos naturais. Também espera-se estimular a realização de novas avaliações quanto as suas propriedades medicinais e tóxicas.

Referências

- Asare G.A., Bugyei, K., Sittie, A., Yahaya, E.S., Gyan, B., Adjei, S., Nyarko, A.K. Genotoxicity, cytotoxicity and toxicological evaluation of whole plant extracts of the medicinal plant *Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae). *Genet Mol.* 2008;11:100-1.
- Babu P.V., Liu D., Gilbert E.R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem.* 2013;24(11):1777-89. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.06.003.
- Brewer L.R., Kubola J., Siriamornpum S., Herald T.J., Shi Y.C. Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. *Food Chem.* 2014;52:483-90. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.128, 2014.
- Queiroz A.C., Alves H.D.S., Cavalcante-Silva L.H.A., Dias T.D.L.M.F., Santos M.D.S., Melo G.M.D.A., Alexandre-Moreira M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Nat Prod Res.* 2014;28(6):403-6. doi:

10.1080/14786419.2013.867444.

Dong M., Hong T., Liu S., Zhao J., Meng Y., Liu J. Hepatoprotective effect of the flavonoid fraction isolated from the flower of *Inula britannica* against D-Galactosamine-induced hepatic injury. *Mol Med Rep.* 2013;7(6):1919-23. doi: 10.3892/mmr.2013.1443.

Dornas W.C., Oliveira T.T.D., Rodrigues R.G.D.; Santos A.F.D., Nagem T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009;28(3):241-9.

Frescura, V.D., Kuhn A.W., Dail H., Tedesco S.B. Post-treatment with plant extracts used in Brazilian folk medicine caused a partial reversal of the antiproliferative effect of glyphosate in the *Allium cepa* test. *Biocell.* 2013;37(2):23-8.

Georgiev V., Ananga A., Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients.* 2014;6(1):391-415. doi: 10.3390/nu6010391.

Giuliani C., Bucci I., Santo S.D., Rossi C., Grassadonia A., Piantelli M., Napolitano G. The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. *Food Chem Toxicol.* 2014;66:23-9. doi: 10.1016/j.fct.2014.01.016.

Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;98(2-3):67-202.

Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J.* 2013;2013:162750. doi: 10.1155/2013/162750. 2013.

Lazary V.M.D. Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama. [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NES-PROM, Brasília, 2010.

Lopes R.M., Oliveira T.D., Nagem T.J., Pinto A.D.S. Flavonóides. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 2010;3(14).

Ma Q. Flavonoids from the Pericarps of *Litchi chinensis*. *J Agric Food Chem.* 2014;62(5):1073-8. doi: 10.1021/jf405750p,

2014 feb 5.

Machado H., Nagem T.J., Peters V.M., Fonseca C.S., Oliveira T.T.D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução.* 2008;27(1-2):33-39.

Meotti F.C. Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: Estudos in vivo e in vitro. [Tese]. Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Santa Maria, RS, Brasil, 2006.

Oda M., Saito Y., Morimune Y., Nagahama M., Sakurai J. Induction of neurite-outgrowth in PC12 cells by alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(2):241-6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.103.

Pan D., Li W., Miao H., Yao J., Li Z., Wei L., Zhao L., Guo Q. LW-214, a newly synthesized flavonoid, induces intrinsic apoptosis pathway by down-regulating Trx-1 in MCF-7 human breast cells. *Biochem Pharmacol.* 2014;87(4):598-610. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.010.

Pericleous M., Rossi R.E., Mandair D., Whyaand T., Caplin M. E. Nutrition and pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(1):9-21.

Pirie A.D., Davies N.W., Ahuja K.D., Adams M.J., Shing C.M., Narkowicz C., Jacobson G.A., Geraghty D.P. Hypolipidaemic effect of crude extract from *Carpobrotus rosii* (pigface) in healthy rats. *Food Chem Toxicol.* 2014;66:134-9. doi: 10.1016/j.fct.2014.01.034.

Porto L.C., Silva J, Ferraz A.B., Corrêa D.S., Santos M.S., Porto C.D., Picada J.N. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:579-85. doi: 10.1016/j.fct.2013.06.048.

Rendeiro C., Foley A., Lau V.C., Ring R., Rodriguez-Mateos A., Vauzour D., Williams C.M., Regan C. Spencer J.P. A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B receptor

function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. *Neuropharmacology*. 2013;79:335-344. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.003.

Ribeiro J.N., Oliveira T.T.D., Nagem T.J., Ferreira Júnior D.B., Pinto A.D.S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. *RBAC*. 2006;38(1): 23-27.

Silva G., Fachin A.L., Belebony R.O., França S.C., Marins M. In vitro action of flavonoids in the canine malignant histiocytic cell line DH82. *Molecules*. 2013;18(12):5448-63. doi: 10.3390/molecules181215448.

Silva P.E.S. Atividade antimicrobiana de *Deris negrensis* Benth (Fabaceae). [Dissertação]. Universidade do Estado do Amazonas, Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Manaus-Amazonas, 2011.

Schreuder T.H., Eijsvogels T.M., Greyling A., Draijer R., Hopman M.T., Thijssen D.H. Effect of black tea consumption on brachial artery flow-mediated dilation and ischaemia-reperfusion in humans. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014;39(2):145-51. doi: 10.1139/apnm-2012-0450.

Tarahovsky Y.S., Kim Y.A., Yagolnik E.A., Muzafarov E.N. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid metal complexes in raft signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(5):1235-1246. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.021.

Todorova M., Trendafilova A. *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *J Ethnopharmacol*. 2014;152(2):256-265.

Torrezan R., Gomes R.M., Ferrarese M.L., de Melo F.B., Ramos A.M, Mathias P.C., Scomparin D.X. Treatment with isoflavones repla-

ces estradiol effect on the tissue fat accumulation from ovariectomized rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(9):1489-96.

Turino F., Belo M.G., Silva A.G. Uma Visão Diagnóstica da Fitoterapia na Pastoral da Saúde. *Natureza online*. 2004;2(1):15-21.

Varanda E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2006; 27(1):1-7.

Verma M., Amresh G., Sahu P.K., Mishra N., Rao C.V., Singh A.P. Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. *Indian J Exp Biol*. 2013;51(1):65-72.

Volp A.C.P., Renhe I. R., Barra K., Stringueta P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Rer Bras Nutr Clin*. 2008;23(2):141-9.

Wang A.H., Liu G.X., Xu F., Shang M.Y., Cai S.Q. Research on chemical fingerprint chromatograms of *Sinopodophyllum hexandrum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013;38(20):3528-33.

Xu S.L., Zhu K.Y., Bi C.W., Yan L., Men S.W., Dong T.T., Tsim K.W. I. Flavonoids, derived from traditional chinese medicines, show roles in the differentiation of neurons: possible targets in developing health food products. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013;99(4):292-9. doi: 10.1002/bdrc.21054.

Yang G.M., Yan R., Wang Z.X., Zhang F.F., Pan Y., Cai B.C. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Chin J Nat Med*. 2013;11(5):519-24. doi: 10.1016/S1875- 5364(13)60094-1.

Yan X.T., Li W., Sun Y.N., Yang S.Y., Lee S.H., Chen J.B., Jang H.D., Kim Y.H. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(5):1397-402. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.01.028.

Intoxicaciones con rodenticidas superwarfarínicos

Superwarfarin rodenticide poisoning

Gallardo Ferrada, Amanda I.*; Lizana Gajardo, Felipe; Gutiérrez Torres, Waldo

Centro de Información Toxicológica. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC). CP: 8330377 Teléfono: +56-9-94695673

*aigallar@uc.cl

Recibido: 19 de julio de 2014

Aceptado: 31 de julio de 2014

Resumen. Introducción: en la actualidad existe utilización masiva de rodenticidas y su venta no está restringida al público. Las etiologías de intoxicación por estos agentes son variadas pudiendo ser de tipo intencional o accidental. **Objetivo:** analizar estudios realizados en torno a intoxicaciones con rodenticidas superwarfarínicos en humanos con el propósito de reunir información que oriente a un adecuado tratamiento. **Metodología:** se realizó una revisión integradora en las bases de datos electrónicas PubMed, TripDataBase, Cochrane, además de Google Scholar y SciELO, libros de divulgación científica, documentos de convenciones, páginas web de instituciones públicas, privadas y artículos vinculados a efectos, cuadro clínico y tratamiento de exposiciones a rodenticidas en seres humanos. Se analizaron los documentos y la información se organizó en tres temáticas: toxicidad de los rodenticidas superwarfarínicos, cuadro clínico y tratamiento médico, y rodenticidas no anticoagulantes disponibles en Chile. **Resultados:** la dosis tóxica mínima reportada en adultos es de 1 mg de principio activo; en pacientes pediátricos ingestas accidentales rara vez producen síntomas. Los síntomas se observan de forma tardía y su toxicidad es variable. El examen de elección es el International Normalized Ratio (INR) y se realiza en todo paciente con factores de riesgo presentes. El antídoto no se administra de forma profiláctica y la dosis se ajusta individualmente. **Conclusión:** en niños las ingestas accidentales no son riesgosas por lo que pueden ser observados en el hogar. Pacientes con ingestas masivas requieren controles de INR por meses por lo que es importante que posterior al alta médica exista una óptima coordinación con nivel primario de atención.

Palabras claves: Rodenticidas; Superwarfarínicos; Anticoagulantes; Intoxicaciones.

Abstract. Introduction: Currently there is a widespread use of rodenticides, unrestricted to the public. The exposure to these agents may varied being intentional or accidental. **Objective:** To analyze studies about superwarfarin poisoning in humans, with the purpose of gathering information to guide proper treatment. **Methodology:** It was conducted an integrative review in the electronic databases PubMed, TripDataBase, Cochrane, Google Scholar and SciELO, science books (reference textbooks), convention documents, websites from public and private institutions and articles about the effects, clinical manifestations and treatment of human exposures to rodenticides. Documents were analyzed and the information organized into three themes: superwarfarin toxicity, clinical features and medical treatment, and non-anticoagulant rodenticides available in Chile. **Results:** In adults, the minimum dose reported to cause toxicity is 1 mg of active ingredient. In pediatric patients, accidental intakes rarely produce symptoms. The symptoms of poisoning are usually delayed and its toxicity is variable. The test of choice is International Normalized Ratio (INR) and it is performed in all patients with risk factors. The antidote must not be administered prophylactically and the dose is adjusted individually. **Conclusions:** Accidental intakes in children are not risky and they can be observed at home. Patients with massive intakes require INR monitoring for months so, it is important that an optimal coordination with primary care facilities still exists after medical discharge.

Keywords: Rodenticides; Superwarfarin; Anticoagulant; Poisoning.

Introducción

Se entiende como rodenticida a cualquier producto comercializado con el fin de matar roedores, ardillas y otros animales pequeños. El rodenticida ideal será aquel que sea tóxico para los roedores y no para los humanos, sin embargo, aún no ha sido desarrollado (Flomenbaum 2011). Se pueden clasificar en dos tipos: anticoagulantes y no anticoagulantes; los primeros se dividen en warfarinas y su-

perwarfarinas (NPIC 2013).

Esta clasificación incluye sustancias como: brodifacoum, difenacoum, bromadiolona, clorfacinona, entre otras (Wu y col. 2009). Su presentación comercial es variada, encontrándose formulaciones tales como pellets, pasta, minibloques, bloques o granos. En Chile, contienen bajas concentraciones de superwarfarinas con cantidades de 0,005 % p/p. Suelen

estar coloreados lo que aumenta el riesgo de ingesta en niños por ser llamativos visualmente. Algunos fabricantes añaden a la formulación del rodenticida compuestos amargantes, como el benzoato de denatonio, con la finalidad de reducir la palatabilidad en seres humanos, sin alterar su efectividad en roedores. Las intoxicaciones asociadas a dichas exposiciones en su mayoría son de tipo accidental observándose alteraciones en las pruebas de coagulación en contados casos (Ingels y col. 2002).

En la actualidad existe una utilización masiva de estos productos, relacionado a su fácil acceso, escasa regulación y conocimiento insuficiente de la peligrosidad de dichos agentes. Por esta razón la presente revisión tiene como objetivo analizar estudios realizados en torno a intoxicaciones con rodenticidas superwarfarínicos en humanos con el propósito de reunir información que oriente a un adecuado tratamiento.

Metodología

Se realizó una revisión integradora permitiendo la inclusión simultánea de investigaciones cuantitativas (experimentales / no experimental) y revisiones de literatura. Fueron utilizadas las bases de datos electrónicas PubMed, TripDataBase, Cochrane, además de Google Scholar y SciELO, libros de divulgación científica, documentos de consenso, páginas web de instituciones públicas, privadas y artículos vinculados a efectos, cuadro clínico y tratamiento de exposiciones a rodenticidas en seres humanos. Las palabras claves para la búsqueda fueron: rodenticidas, anticoagulantes, intoxicaciones. Se consideró la disponibilidad gratuita de textos completos idioma español o inglés, excluyéndose aquellos trabajos en los que se encontraba disponible solo el resumen y aquellos en que no pudo ser considerado el texto completo al momento de la revisión. Para la selección de artículos se consideró la opinión de expertos en el área, para dirigir y acotar la búsqueda de los temas, así como las limitaciones del estudio.

Se analizaron los documentos y la información fue organizada en tres temáticas: toxicidad de los rodenticidas superwarfarínicos, cuadro clínico y tratamiento médico y rodenticidas no anticoagulantes disponibles en Chile.

Finalmente, se seleccionaron 28 artículos, 5 libros, 7 páginas web de organizaciones y 3 noticias en línea, según los criterios establecidos.

Resultados

Los superwarfarínicos actúan de manera similar a la warfarina o el acenocumarol, inhibiendo la enzima vitamina K1 2,3 epóxido reductasa y con ello la síntesis de vitamina K1 (fitomenadiona) y la posterior activación de los factores de coagulación II, VII, IX y X. La enzima lleva a cabo la regeneración de la vitamina K1 después que ha sido oxidada a vitamina K1 2,3 epóxido, la cual es biológicamente inactiva y su concentración se ve aumentada por la exposición a superwarfarinas. Su regeneración es alterada casi inmediatamente después de la ingestión de este tipo de sustancias, sin embargo, los síntomas no se observan hasta dos a tres días después (Bruno y col. 2000).

Son bien absorbidos en el tracto gastrointestinal y existen datos que indicaría que la absorción percutánea es posible, aunque no existe evidencia concreta de ello (Burkhart 2001). Son altamente liposolubles, en sangre tienen una alta unión a albúmina y se distribuyen principalmente en el hígado (Lai 2007). Algunas vidas medias de eliminación reportadas según compuesto activo son: brodifacoum 24 a 31 días (Pavlu y col. 2005), bromadiolona 6 a 13 días (Vindenes y col. 2008) y clorofacinona de 5 a 11 días (Burucoa y col. 1989).

La potencia y duración del efecto anticoagulante se atribuyen principalmente a su alta afinidad por la vitamina K1 2,3 epóxido reductasa, habilidad para inhibir la quinona reductasa, acumulación hepática, vidas medias inusualmente largas junto con su alta liposolubilidad y circulación enterohepática (Watt y col. 2005). Estas características pueden explicar por qué el efecto anticoagulante puede persistir desde varios días hasta meses, incluso cuando ya no son detectables en plasma sanguíneo (Lipton y col. 1984).

Existen diversos estudios que han tratado de establecer la dosis tóxica y severidad del cuadro clínico según la dosis ingerida, un ejemplo es el de Wu, quien mostró que ingestas de brodifacoum en dosis entre 4,5 a 24 mg causaron sangrados, que fueron evidenciados por presencia de hematuria, gingivorragia y equimosis múltiple, asociado a tiempos de protrombina (TP) extremadamente prolongados (Wu y col. 2009).

La dosis mínima reportada de brodifacoum asociada a toxicidad fue de 1 mg en un paciente de 20 años que resultó en sangrados leves sin riesgo vital (Caravati y col. 2007; MICROMEDEX 2.0 2014).

Otros casos reportados

Paciente de 62 años que presentó efectos moderados luego de ingerir 43 g de pellets (2,15 mg de brodifacoum) asociado a ingesta de alcohol y anticongelante para vehículos (Ross y col. 1992). Paciente embarazada que ingirió una caja de rodenticida desarrollando sangrados sin riesgo vital, sin embargo, no hubo datos sobre efectos a nivel fetal (Sheen y col. 1994). Paciente de 25 años que ingirió 52,5 g de pellets (2,6 mg de brodifacoum) en un periodo de dos meses resultó en muerte (Kruse y col. 1992). Paciente de 17 años que ingirió 7,5 mg de brodifacoum y resultó en sangrados sin compromiso vital (Jones y col. 1984).

Los pacientes pediátricos son el grupo etario más expuesto a las intoxicaciones por rodenticidas de forma accidental, numerosos estudios han intentado estimar una dosis tóxica para este grupo de pacientes. En 1998 se propuso que la dosis tóxica de superwarfarina en niños era mayor a 0,1 mg/kg (Lai 2007), mientras que otros autores concluyeron que la dosis tóxica en niños es superior a 0,0125 mg/kg (Burkhart 2001), es decir, 8 veces menos que la dosis propuesta anteriormente. En el año 2004 se sugirió que la cantidad de rodenticida necesaria para que un niño presentara sintomatología era de más de 10 a 14 g/kg (Yip 2004). En contraste, Watt y col. (2005) refieren que un niño de 10 kg de peso debiera ingerir 30 g de rodenticida (1,5 mg del activo) para evidenciar alteraciones en la coagulación, es decir, entre 3 a 4,5 veces menos a la propuesta previamente.

Ingels y col. (2002) analizaron la exposición de 542 niños a rodenticidas a los cuales no se les realizó ninguna medida de descontaminación ni tratamiento profiláctico: 2 de ellos tuvieron elevación del INR y permanecieron asintomáticos, mientras que otros 2 pacientes presentaron epistaxis. Los autores concluyeron que en niños con ingestas de tipo accidental, rara vez producen síntomas (Ingels y col. 2002).

Una revisión bibliográfica realizada durante los años 1986 al 2000 que incluyó a 11.751 niños menores de 6 años, reportó la prolongación del INR en 59 de ellos y solo en 11 se reportaron sangrados menores tales como epistaxis, hemartrosis leve, hematoquecia, entre otros (Minnesota Poison Control System 2009). Por su parte, Caravati y col. (2007) analizaron múltiples estudios donde fueron reportados casi 20.000 exposiciones en niños menores de 6 años, de los cuales solo 14 presentaron sig-

nos de toxicidad mínima, es decir, cuadros irritativos gastrointestinales y prolongación del TP, sin sangrados (Caravati y col. 2007).

La cantidad de principio activo contenido en cada uno de los 45 rodenticidas superwarfarínicos registrados en Chile es variable, sin embargo, la mayoría de los productos formulados en pellets vienen en bolsas de 10 gramos con 50 pellets cada una. Por lo tanto, 1 mg de activo se obtendría consumiendo 2 bolsas, es decir, alrededor de 100 pellets. Respecto a los bloques la mayoría contiene 20 gramos lo que corresponde a 1 mg de activo (ISP 2014).

Cuadro clínico y tratamiento médico

Los efectos anticoagulantes no son observables hasta que los niveles de vitamina K1 disminuyen y los factores de coagulación activos son removidos de la circulación. Por ello, a pesar que el pico plasmático del rodenticida es entre 2-8 horas post-ingesta, la anticoagulación puede demorar por lo menos 15 horas, presentándose usualmente a las 24 horas con un máximo de efectos clínicos observables a partir del segundo o tercer día post ingesta (Watt y col. 2005). Alteraciones del TP e INR ocurren cuando los niveles de los factores disminuyen a un 25 % de los valores normales (Lai 2007; Flomenbaum 2011).

Existen múltiples factores de riesgos que dificultan el manejo del cuadro y que, por lo tanto, condicionarán el tratamiento indicado, como por ejemplo: intencionalidad suicida, abuso, mal uso, ingesta crónica, terapia anticoagulante concomitante, entre otros (Weitzel y col. 1990; Watt y col. 2005).

Se considera intoxicación leve a la presencia de efectos locales, con irritación del tracto gastrointestinal, caracterizados por: dolor abdominal, diarrea y vómitos (Flomenbaum 2011). La intoxicación moderada hace referencia a la aparición de sangrados que no ponen en riesgo la vida del paciente, tales como: equimosis, hematomas, hemartrosis, epistaxis, gingivorragia, hematoquecia, melena, hematuria, menometrorragia, hematemesis, hemoptisis (Lipton y col. 1984; Barnett y col. 1992; Flomenbaum 2011). Finalmente, se define como intoxicación severa, cuando existen hemorragias graves que pueden comprometer la vida del enfermo, como: hemorragias gastrointestinales masivas, pulmonar o intracraneal (Watt y col. 2005; Caravati y col. 2007).

El manejo clínico de estos pacientes estará

indicado sólo para aquellos que posean factores de riesgo asociados o que hayan consumido al menos 1 mg de brodifacoum. Debiendo tenerse en cuenta, que la ausencia de signos o síntomas no excluye una potencial ingesta tóxica, por lo que se debe acudir a un servicio médico de urgencia, si alguno de los dos criterios antes mencionados se cumplen (Watt y col. 2005).

La realización de lavado gástrico puede ser considerada en caso de ingestas masivas y solo dentro de la primera hora posterior a ésta, no existiendo evidencia disponible que indique que esta medida reduzca su absorción (Ingels y col. 2002; Benson y col. 2013), por lo que su indicación no debe ser una práctica de rutina. Mientras que la administración de carbón activado en dosis única, sí evidencia *in vitro* que la warfarina y el brodifacoum son adsorbidos cuando se administra hasta 1 hora post-ingesta (Chyka y col. 2005).

El examen de laboratorio de referencia es la detección de alteraciones en el INR. El cual debe ser realizado a todo paciente derivado a un servicio de urgencias que posea factores de riesgo. Algunos autores concluyen que se debe medir a las 36 y 48 horas y que, en caso de resultar normales, no se requiere mayor manejo clínico (Watt y col. 2005). Otros autores sugieren realizar controles a las 48 y 72 horas (Lipton y col. 1984), si alguno resultara alterado, la medición del INR debería entonces realizarse cada 6 horas.

Existen otras alternativas de laboratorio como es el control de niveles sanguíneos de estos agentes (Burucoa y col. 1989; Hollinger y col. 1993; Bruno y col. 2000), sin embargo, aún no están disponibles en nuestro país.

Dado que los anticoagulantes interrumpen el ciclo de síntesis de vitamina K1, ésta debe ser administrada de forma exógena hasta que el anticoagulante sea eliminado. Su administración debe estar basada en evidencia de laboratorio o de coagulopatías, por lo que no debe ser administrada profilácticamente. La terapia con antídoto se indica ante la evidencia de sangrados activos o INR alterado. Existen diferentes propuestas respecto al valor de INR con el cual se debe dar inicio a la terapia antidótica con fitomenadiona. El valor más conservador es de 2 (Lai 2007), otros investigadores proponen valores mayores o iguales a 4, con base en estudios indican que valores de INRs superiores a dicho valor, significaría un aumento de 7 veces el riesgo de sufrir una

hemorragia subdural y 4 veces de sufrir una hemorragia intracerebral (Hylek y col. 1994). La Organización Mundial de la Salud considera como valor alterado aquel que es igual o superior a 5, por lo que en ese contexto se inicia la terapia específica con fitomenadiona (WHO 2006). Siendo vía endovenosa la preferente para administrar el antídoto en los casos severos, donde se requiere una rápida corrección del INR (Wu y col. 2009), con el antecedente de haberse reportado reacciones anafilácticas por esta vía (Lai 2007).

Por vía endovenosa, la dosis a utilizar es de 10 mg, las que puede ser repetida cada 6 a 8 horas, según necesidad (MICROMEDEX 2.0 2014). Algunas dosis reportadas van desde 20 mg hasta 600 mg día, administradas vía oral (Lipton y col. 1984; Burucoa y col. 1989; Ross y col. 1992; MICROMEDEX 2.0 2014).

Se han informado terapias prolongadas, en las que se ha requerido terapia antidótica hasta 8 meses post ingesta (Burucoa y col. 1989; Babcock y col. 1993; WHO 1994; Chua y Friedenberg 1998; Chong y col. 2009).

Dentro de las terapias de última generación, dirigidas a pacientes con cuadros de intoxicación grave, está la administración de complejo protrombina (Octaplex 500™) 50 unidades por kilo (Hoffman y col. 1988; Watt y col. 2005) o factor VII recombinante (Kogenate™) (Yasaka y col. 2003; Watt y col. 2005), no existiendo reportes nacionales de su uso con el objeto de revertir este tipo de intoxicaciones.

Respecto al manejo clínico en pacientes pediátricos, un estudio sugiere que se deben realizar controles de INR a todo niños que ingieran este tipo de rodenticidas (Flomenbaum 2011), mientras que otras investigaciones concluyen que ingestas accidentales no requieren tratamiento a menos que existan factores de riesgo asociados (Burkhart 2001; Lai 2007). En ingestas accidentales se sugiere que el manejo debería ser en el hogar, con observación de síntomas durante los primeros tres días, no requiriéndose la realización de medidas tales como: descontaminación gástrica, monitorización de TP y administración de vitamina K1 (Burkhart 2001; Watt y col. 2005; Zupancic-Salek y col. 2005; Caravati y col. 2007; Lai 2007). Las mismas recomendaciones aplican para adultos que han consumido rodenticidas de manera accidental, siempre y cuando no se encuentren bajo terapia anticoagulante.

En la actualidad no existe una pauta de tratamiento con dosis de vitamina K1 estanda-

rizadas, por lo que éstas deberán ser ajustadas individualmente con el objetivo de tener un INR inferior a 2 (Sheperd y col. 2002; Lai 2007). En Chile, la vitamina K₁ solo se encuentra disponible en ampollas, la que puede ser administrada por vía oral; atento a que se debe evitar la vía intramuscular a fin de prevenir la aparición de hematomas.

Rodenticidas no anticoagulantes disponibles en Chile

Hoy en día los rodenticidas superwarfarínicos abarcan casi la totalidad de las formulaciones disponibles para el control de roedores, sin embargo, existen otras sustancias muy opuestas en cuanto a tipo de agente, cuadro clínico y tratamiento, entre otras características.

En este apartado nos referiremos a agentes como: fosfuros metálicos, estricnina y "El Asesino".

Fosfuros metálicos: estos agentes son utilizados como fumigantes para la protección de alimentos en zonas cerradas, siendo ampliamente comercializados a nivel mundial y nacional. El Servicio Agrícola y Ganadero cuenta con tres productos que contienen dicho agente, registrados dentro de su listado de plaguicidas autorizados (SAG 2014). El Instituto de Salud Pública cuenta con nueve de estos compuestos, siendo su condición de venta restringida al público (ISP 2014).

Las intoxicaciones con estos compuestos tienen una rápida presentación clínica, dependiendo de la cantidad ingerida, estimándose la aparición de síntomas entre 15 y 180 minutos o entre las primeras 12 a 18 horas (Gupta 2012). La sintomatología observada inicialmente es intensa irritación del tracto gastrointestinal y vías respiratorias, conduciendo a vómitos profusos y dolor epigástrico. Posteriormente se desarrolla hipotensión, taquipnea y acidosis metabólica. Si el tratamiento no es oportuno, la muerte ocurre cerca de 30 horas posterior a la ingestión por paro cardiorespiratorio a causa del daño celular al miocardio (Gupta 2012).

Estricnina: utilizada desde el siglo XVI hasta la actualidad para el control de roedores, aves e insectos. En Chile no existen registros de productos que lo contengan, sin embargo, en los años 2009 y 2011, este activo fue utilizado para cuatro matanzas masivas de perros en Talcahuano y, en diciembre del 2013, se informó otro suceso similar en la villa San Pedro de la Paz en donde se presume que este agente

fue el causal (Biobiochile.cl 2009; Biobiochile.cl 2011; Biobiochile.cl 2013).

La clínica difiere a la de los anticoagulantes y fosfuros, debido a que produce intensas convulsiones que se presentan durante los primeros 15 a 20 minutos posterior a la ingestión producto de la intensa excitabilidad del SNC y la muerte se produce secundaria a falla respiratoria (Lai 2007).

El Asesino: desde hace varios años se han estado recibiendo informes de intoxicaciones con este producto. Las intoxicaciones se reportan principalmente en la primera y segunda región de Chile, dado que este rodenticida ingresa ilegalmente al país desde Perú, donde sí está registrado para su uso doméstico (MINSAL 2010). El activo de este producto es aldicarb, un carbamato clasificado por la OMS en la categoría Ia, es decir, extremadamente peligroso (IPCS/WHO 2006). En Chile, el aldicarb se encuentra en el listado de plaguicidas prohibidos desde el año 2011 (SAG 2014).

La sintomatología es un cuadro colinérgico con predominancia muscarínica (Bucaretschi y col. 2012). El tratamiento es de soporte, recomendándose la administración de atropina para contrarrestar la sintomatología. Dado que aldicarb es un carbamato, el cuadro clínico es de corta duración esperando recuperación completa de la acetilcolinesterasa dentro de las primeras 48 horas (Bucaretschi y col. 2012).

Conclusiones

Los rodenticidas superwarfarínicos son compuestos altamente liposolubles, con vidas medias prolongadas y mecanismo de acción basado en la inhibición de la síntesis de vitamina K1. La información disponible en torno a dosis tóxica es limitada, existiendo datos poco claros al respecto. A pesar de ello, distintos autores han establecido como dosis tóxica mínima para adultos la de 1 mg de activo de superwarfarina. Respecto a dosis tóxica en niños, no ha sido determinada con exactitud, sin embargo, para que se presenten alteraciones, se requeriría consumir grandes cantidades de rodenticida, situación que de forma accidental raramente sucede, por este motivo es que se sugiere la evaluación en domicilio de estos pacientes, sucediendo igual para el caso de adultos que presenten ingestas accidentales y no posean factores de riesgo asociado. Los efectos clínicos generalmente no se aprecian antes de las 48 horas post ingesta, y pueden incluir desde síntomas irritativos

gastrointestinales hasta la aparición de sangrados que podrían comprometer la vida del intoxicado.

El examen de elección, para determinar alteraciones de coagulación, es el INR, que en caso de presentar variaciones y según factores de riesgo, dará lugar a que se programe el seguimiento bioquímico a cumplir.

El antídoto ha de ser titulado según hallazgos de laboratorio, ya que no se puede tratar a un paciente con dosis estandarizadas, atento a que el tratamiento es completamente individual.

Posterior al alta de un paciente, es importante mantener una buena coordinación con el nivel primario de atención, sobre todo en aquellos intentos suicidas, con la finalidad de realizar controles seriados de INR, ya que estos pacientes suelen requerir tratamientos prolongados, que superan los 8 meses posterior a la ingesta.

Las formulaciones de rodenticidas superwarfarínicos son variadas, además estos agentes no son los únicos disponibles en Chile, por ello es importante que el equipo de salud consulte con su centro de información toxicológico, aportando datos relevantes como cantidad estimada de ingesta, formulación y marca del producto, con el fin de orientar en el diagnóstico y tratamiento a seguir.

Bibliografía citada

Babcock J., Hartman K., Pedersen A., Murphy M., Alving B. Rodenticide induced coagulopathy in a young child. A case of Munchausen syndrome by proxy. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* [en línea] 1993;15(1):126–130. [Consulta 27 de Marzo 2014]. Disponible en: <http://journals.lww.com/jpho-online/pages/articleviewer.aspx?year=1993&issue=02000&article=00021&type=abstract>.

Barnett V.T., Bergmann F., Humphrey H., Chediak J. Diffuse alveolar hemorrhage secondary to superwarfarin ingestion. *Chest.* [en línea] 1992;102(4):1301–1302. [Consulta 1 de abril 2014]. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1065484>

Benson B.E., Hoppu K., Troutman W.G., Bedry R., Erdman A., Höjer J., Mégarbane B., Thanacoody R., Caravati E.M. Position paper update: gastric lavage for gastrointestinal decontamination. *Clin Toxicol.* [en línea] 2013;51:140-

146. [Consulta 26 de marzo 2014]. Disponible en: <http://www.clintox.org/documents/positionpapers/GastricLavage.pdf>.

Biobiochile.cl. [en línea] 2009. [Consulta 25 de marzo 2014]; [1 p.]. Disponible en: <http://www.biobiochile.cl/2009/11/18/formalizan-a-funcionario-de-municipalidad-de-talcahuano-por-eliminaciones-masivas-de-perros-con-estricnina.shtml>.

Biobiochile.cl. [en línea] 2011. [Consulta 25 de marzo 2014]; [1 p.]. Disponible en: <http://www.biobiochile.cl/2011/08/03/denuncian-que-10-perros-de-raza-fueron-envenenados-con-estricnina-en-san-pedro-de-la-paz.shtml>.

Biobiochile.cl. [en línea] 2013. [Consulta 25 de marzo 2014]; [1 p.]. Disponible en: <http://www.biobiochile.cl/2013/12/04/presentan-denuncia-por-matanza-de-perros-con-veneno-en-san-pedro-de-la-paz.shtml>.

Bucarechi F., Prado C.C., Branco M.M., Soubhia P., Metta G.M., Mello S.M., de Capitani E.M., Lanaro R., Hyslop S., Costa J.L., Fernandes L.C.R., Vieira R.J. Poisoning by illegal rodenticides containing acetylcholinesterase inhibitors (chumbinho): a prospective case series. *Clinical Toxicology.* [en línea] 2012;50(1):44–51. [Consulta 30 de marzo 2014]. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/15563650.2011.639715>.

Bruno G.R., Howland M.A., McMeeking A., Hoffman R.S. Long-acting anticoagulant overdose: Brodifacoum kinetics and optimal vitamin K dosing. *Ann Emerg Med.* [en línea] 2000;36(3):262–267. [Consulta 17 de marzo 2014]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196064400589938>.

Burkhart K.K. Anticoagulant rodenticides. En: Ford M.D., Delaney K.A., Ling J., Erickson T. *Clinical toxicology.* Philadelphia: WB Saunders; 2001. P. 848–853.

Burucoa C., Mura P., Robert R., Boinot C., Bouquet S., Piriou A. Chlorophacinone intoxication. A biological and toxicological study. *J Toxicol Clin Toxicol* [en línea] 1989;27(1-2):79–89. [Consulta 21 de marzo 2014]. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/15563658909038571>.

Caravati E.M., Erdman A.R., Scharman E.J., Woolf A.D., Chyka P.A., Cobaugh D.J., Wax P.M., Manoguerra A.S., Christianson G., Nelson L.S., Olson K.R., Booze L.L., Troutman W.G. Long-acting anticoagulant rodenticide poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila)*. [en línea] 2007;45(1):1-22. [Consulta 15 de marzo 2014]. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/15563650600795487>.

Chong L.L., Chau W.K., Ho C.H. A case of "superwarfarin" poisoning. *Scand J Haematol*. [en línea] 2009;36:314-315. [Consulta 27 de marzo 2014]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0609.1986.tb01740.x/epdf>.

Chua J.D., FriedenberG W.R. Superwarfarin poisoning. *Arch Intern Med*. [en línea] 1998;158(17):1929-1932. [Consulta 27 de marzo 2014]. Disponible en: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=209500>.

Chyka P.A., Seger D., Krenzelok E.P., Vale J.A., Position paper: Single-dose activated charcoal. *Clin Toxicol (Phila)*. [en línea] 2005;43(2):61-87. [Consulta 30 de marzo 2014]. Disponible en: <https://www.clintox.org/documents/positionpapers/SingleDoseActivatedCharcoal.pdf>.

Flomenbaum N.E. Pesticides: An Overview of Rodenticides and a Focus on Principles. En: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. New York: McGraw-Hill Medical; 2011. p. 1423-1433.

Gupta R.C. Non-anticoagulant rodenticides. En: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Academic Press Elsevier; 2012. p. 698-711.

Hoffman R.S., Smilkstein M.J., Goldfrank L.R. Evaluation of coagulation factor abnormalities in long-acting anticoagulant overdose. *J Toxicol Clin Toxicol*. [en línea]. 1988;26(2-3):233-248. [Consulta 1 de abril 2014] Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/15563658809000350>.

Hollinger B.R., Pastoor T.P. Case management and plasma half-life in a case of brodifacoum poisoning. *Arch Intern Med*. [en línea] 1993;153(16):1925-1928. [Consulta 1 de abril

2014]. Disponible en: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=617720>.

Hylek E.M., Singer D.E. Risk factors for intracranial hemorrhage in outpatients taking warfarin. *Ann Intern Med*. 1994;120(11):897-902.

Ingels M., Lai C., Tai W., Manning B.H., Rangan C., Williams S.R., Manoguerra A.S., Albertson T., Clark R.F. A prospective study of acute, unintentional, pediatric superwarfarin ingestions managed without decontamination. *Ann Emerg Med* [en línea]. 2002;40(1):73-8. [Consulta 15 de marzo 2014] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196064402000112>.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). Recommended classification of pesticides by hazard, and guidelines to classification. IPCS/WHO. 2006 [Consulta 28 de diciembre 2013]. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf.

Instituto de Salud Pública (ISP). Sistema de consulta de productos registrados. [en línea]. 2014 [Consulta 24 de febrero 2014]. Disponible en: <http://www.gicona.ispch.cl/RegistrosISP/fiMenu.asp>.

Jones E.C., Grove G.H., Naiman S.C. Prolonged anticoagulation in rat poisoning. *JAMA* [en línea]. 1984;252(21):3005-3007. [Consulta 30 de marzo 2014] Disponible en: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=395472>.

Kruse J.A., Carlson R.W. Fatal rodenticide poisoning with brodifacoum. *Ann Emerg Med*. [en línea]. 1992;21(3):331-6. [Consulta 27 de marzo 2014] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019606440580900X>.

Lai M.W., Burns M. Anticoagulants. En: *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 1051-1064

Lipton R.A., Klass E.M., Evan M., Klass M.D. Human ingestion of a "superwarfarin" rodenticide resulting in a prolonged anticoagulant effect. *JAMA*. [en línea]. 1984;252(1):3004-3005. [consulta 28 de marzo 2014] Disponi-

ble en: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=395470>.

MICROMEDEX 2.0 [en línea] Greenwood Village, Truven Health Analytics, c2014 [consulta 28 de Abril 2014]. Disponible en: <http://micromedex.com>.

Ministerio de Salud (MINSAL): Intoxicaciones agudas por plaguicidas (CIE 10: T60.0 - T60.1, L23.5, L23.8, L24.5, L25.3, H01.1, H16.2) Situación epidemiológica, enero a julio 2010. Santiago: Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud de Chile. [en línea]. [consulta 30 de marzo 2014]; [1 p.]. Disponible en: http://epi.minsal.cl/epi/html/AtlasInteractivos/AtlasBEM/AB_86/Revep.htm.

Minnesota Poison Control System. Condado de Hennepi, Minnesota. Anticoagulant Rodenticides Long- Acting Anticoagulant Rodenticides. [en línea] 2009. [Consulta 28 de abril 2014]. Disponible en: http://www.mn-poison.org/medicalprofessionals/NewslettersandReviews/AnticoagulantRodenticides/POISON_DATA_150.

National Pesticide Information Center (NPIC). Rodent Control and Rodenticides. [en línea] 2013. [Consulta 28 de marzo 2014]. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pi113>

Pavlu J., Harrington D.J., Voong K., Savidge G.F., Jan-Mohamed R., Kaczmarek R., Superwarfarin poisoning. *The Lancet*. [en línea] 2005; 365: 628. [Consulta 27 de marzo 2014] Disponible en: [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(05\)17916-1.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(05)17916-1.pdf).

Ross G.S., Zacharski L.R., Robert D., Rabin D.L. An acquired hemorrhagic disorder from long-acting rodenticide ingestion. *Arch Intern Med*. [en línea]. 1992;152(2):410-2. [Consulta 27 de marzo 2014]. Disponible en: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=616023>.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Listado de plaguicidas. [en línea]. [Consulta 24 de febrero 2014]. Disponible en: <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/evaluacion-y-autorizacion-de-plaguicidas>.

Sheen S.R., Spiller H.A., Grossman D. Symptomatic brodifacoum ingestion requiring high-dose phytonadione therapy. *Vet Hum Toxicol*. [en línea] 1994;36(3):216-7. [Consulta 30 de marzo 2014] Disponible en: <http://www.biomedsearch.com/nih/Symptomatic-brodifacoum-ingestion-requiring-high/8066968.html>.

Sheperd G., Klein-Schwartz W., Anderson B.D. Acute, unintentional pediatric brodifacoum ingestions. *Pediatr Emerg Care*. [en línea] 2002;18(3):174-178. [Consulta 24 de marzo 2014] Disponible en: <http://journals.lww.com/pec-online/pages/articleviewer.aspx?year=2002&issue=06000&article=00006&type=pdf>.

Smolinske S.C., Scherger D.L., Kearns P.S., Wruk K.M., Kulig K.W., Rumack B.H. Superwarfarin poisoning in children: a prospective study. *Pediatrics*. [en línea]. 1989;84(3):490-494. [Consulta 1 de abril 2014]. <http://pediatrics.aappublications.org/content/84/3/490.full.pdf+html>.

Sound management of pesticides, and diagnosis and treatment of pesticide poisoning. World Health Organization, Geneva. [en línea] 2006. [Consulta 28 de abril 2014] Disponible en: http://www.who.int/entity/whopes/recommendations/IPCSPesticide_ok.pdf?ua=1.

Tsutaoka B., Miller M., Fung S., Patel M., Olson K. Superwarfarin and Glass Ingestion with Prolonged Coagulopathy Requiring High-Dose Vitamin K1 Therapy. *Pharmacotherapy* [en línea]. 2003;23(9):1186-1189. [Consulta 20 de abril 2014] Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1592/phco.23.10.1186.32755/pdf>

Vindenes V., Karinen R., Hasvold I., Bernard J.P., Mørland J.G., Christophersen A.S. Bromadiolone poisoning: LC-MS method and pharmacokinetic data. *J Forensic Sci*. [en línea] 2008;53(4):993-6. [Consulta 21 de marzo 2014] doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00737.x.

Watt B.E., Proudfoot A.T., Bradberry S.M., Vale J.A. Anticoagulant rodenticides. *Toxicol Rev*. [en línea] 2005; 24(4):259-69. [Consulta 18 de marzo 2014] Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.2165%2F00139709-200524040-00005>.

Weitzel J.N., Sadowski J.A., Furie B.C., Moorose R., Kim H., Mount M.E., Murphy M.J., Furie B. Surreptitious ingestion of a long-acting vitamin K antagonist/rodenticide, brodifacoum: clinical and metabolic studies of three cases. *Blood*. [en línea] 1990;76(12):2555-2559. [Consulta 1 de abril 2014]. Disponible en: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/76/12/2555.long>.

Wu Y.F., Chang C.S., Chung C.Y., Lin H.Y., Wang C.C., Shen M.C. Superwarfarin intoxication: hematuria is a major clinical manifestation. *Int J Hematol*. [en línea] 2009;90(2):170-3. [Consulta 23 de marzo 2014]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12185-009-0374-6>.

Yasaka M., Oomura M., Ikeno K., Naritomi H., Minematsu K. Effect of prothrombin complex concentrate on INR and blood coagu-

lation system in emergency patients treated with warfarin overdose. *Ann Hematol* [en línea] 2003;82(2):121-3. [Consulta 27 de marzo 2014]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00277-002-0568-y#page-1>.

Yip L. Anticoagulant rodenticides. En: Dart R.C. *Medical toxicology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 2004. p. 1497-1507.

Zupancic-Salek S., Kovacevic-Metelko J., Radman I. Successful reversal of anticoagulant effect of superwarfarin poisoning with recombinant activated factor VII. *Blood Coagul Fibrinolysis*. [en línea] 2005; 16(4): 239-44. [Consulta 30 de marzo 2014]. Disponible en: <http://journals.lww.com/sci-hub.org/bloodcoagulation/pages/articleviewer.aspx?year=2005&issue=06000&article=00002&type=pdf>.

REPORTES DE CASOS

Ayahuasca, qualidade de vida e a esperança de adictos em recuperação: relatos de caso

Ayahuasca, quality of life and the hope in recovering of addicts: case reports

Dias de Jesus Júnior, Tenes¹; de Oliveira Salvi, Jeferson^{2*}; Ramos Evangelista, Dilson Henrique³

¹Laboratório Exame. R Maringá, 647 - Nova Brasília, CEP: 76908-40, Ji-Paraná – Rondônia, Brasil. ²Departamento de Farmácia, Centro Universitário Luterano de Ji-paraná (CEULJI/ULBRA), Av. Engº Manfredo Barata Almeida da Fonseca, 762, Jardim Aurélio Bernardi - Caixa Postal 271 - CEP 76.907-438 - Ji-Paraná - Rondônia, Brasil ³Departamento de Matemática e Estatística de Ji-paraná, Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Ji-Paraná, RO. Rua Rio Amazonas, 351, Jardins dos Migrantes, CEP 96900-726 – Ji-Paraná, RO – Brasil.

jefersonsalvi@hotmail.com

Recibido: 11 de junio de 2014

Aceptado: 9 de marzo de 2015

Resumo. O uso contínuo da Ayahuasca é objeto de estudo devido aos poucos dados pré-clínicos e clínicos referentes à segurança em relação ao seu uso prolongado. Evidências científicas demonstram os benefícios no âmbito psicoterapêutico, à eficácia junto ao tratamento do etilismo crônico e outras drogas de abuso. Esta pesquisa trata-se de um estudo observacional do tipo relato de casos, com o intuito de descrever e relacionar a experiência do uso ritualístico da Ayahuasca à descontinuidade do uso abusivo de substâncias químicas. Os participantes (n=6) constituíram-se de pessoas institucionalizadas em uma comunidade religiosa que faz uso ritualístico do preparado dos vegetais *Banisteriopsis caapi* e *Ptychocheilichnebi viridis*. Por meio de entrevistas individuais registrou-se o histórico de cada indivíduo com base no período de uso e a substância química utilizada. Em seguida aplicou-se questionários específicos para determinar a qualidade de vida e o nível de esperança. Determinou-se os parâmetros hematológicos a fim de avaliar eventuais disfunções hematopoiéticas e por fim avaliou-se a satisfação destes em participar da pesquisa. Observou-se baixos valores ($p>0,05$) para os domínios de capacidade funcional e limitações por aspectos emocionais, o nível de esperança médio foi significativo ($p=0,02$) e sustentou as perspectivas positivas registradas nas entrevistas, os valores hematológicos estiveram dentro da normalidade e foi alto o nível de satisfação dos participantes com a pesquisa. Concluiu-se que a utilização da Ayahuasca, por meio de um segmento religioso, contribuiu de maneira fundamental para o abandono ou descontinuidade do uso de substâncias química, sendo considerada pelos mesmos uma forma de tratamento.

Palavras chave: Dependência química; Santo Daime; Qualidade de Vida; Relatos de caso

Abstract. The continuous use of Ayahuasca is the aim of various studies due to few preclinical and clinical data related to security in relation to its prolonged use. Scientific evidences demonstrate the benefits of psychotherapeutic efficacy in the treatment of chronic alcoholism and other drugs abuse. This research is an observational study of reported cases aiming to describe and relate the experience of the religious ritual that uses Ayahuasca to the discontinuity of the overuse of chemicals. Participants (n = 6) consisted of members of a religious community that makes use of ritualistic infusion of the plants *Banisteriopsis caapi* and *Ptychocheilichnebi Viridis*. Through individual interviews, the history of each based on the period of use and the chemical substance used was recorded. Then specific questionnaires to determine the quality of life and level of hope were applied. Haematological examinations were performed to determine the possible hematopoietic disorders and finally, their satisfaction in participating in the research was evaluated. Low values ($p>0.05$) for the domains of functional capacity and limitations due to emotional problems were observed. The average level of hope was significant ($p=0.02$) and sustained positive outlook recorded in the interviews, the hematological values were within normal limits and the degree of participant satisfaction was high with the search. It was concluded that the use of Ayahuasca through a religious segment contributed mainly to the abandonment or discontinuation of the use of chemical substances, being considered a form of treatment.

Keywords: Chemical dependence; Hoasca; Quality of life; Case reports

Introdução

Drogas ilícitas e lícitas são substâncias que têm a capacidade de ocasionar vício ou de-

pendência, ambos desígnios reconhecidos como doença crônica do cérebro. A depen-

dência química possui um desenvolvimento progressivo associado a influência genética, considera-se que o início está relacionado às interações psicológicas e físicas do indivíduo e, quando não tratada, pode ser fatal (El-Guebaly 2010; Smith 2011).

Entre os anos de 2009 e 2010, estimava-se que o número de indivíduos que já fizeram uso de substâncias proibidas ou controladas, ao menos uma vez, era de cerca de 272 milhões, tal valor correspondia a 6,1 % de toda população do mundial (UNODOC 2011). Alguns autores consideravam que aproximados 10 % da população urbanizada faz uso abusivo de drogas, sendo que o uso do álcool e da nicotina apresenta maior prevalência (Kessler et al. 1997; Grant et al. 2004; Pinho 2008). Estudo desenvolvido em Porto Velho (BRASIL 2010), capital do estado de Rondônia, demonstrou que 23 % da população de estudantes se referiram ao uso de substâncias químicas lícitas ou não, sendo que, a utilização do álcool contemplou o primeiro lugar (55,6 %), seguido pelo tabaco e pelo uso de solventes/inalantes. O consumo de forma repetitiva de certas substâncias químicas pode levar o indivíduo a expressar comportamentos compulsivos que o caracterizam como adicto, há o desejo de utilizar o objeto-droga constantemente, sem considerar as consequências advindas de tais atos. A adicção, portanto, pode ser definida pelo uso repetitivo de uma droga ou dependência de uma substância química. Como consequência há a neuroadaptação, caracterizada pela distorção ao nível cerebral modificando ou influenciando no que realmente é necessário para a manutenção da homeostase do organismo (ASAM 2011).

O chá da ayahuasca é obtido por meio da decoção das folhas do arbusto *Pycotria viridis* com o cipó da espécie *Banisteriopsis caapi*. A primeira planta, descrita em 1977, apresenta em suas folhas o alcalóide N,N-dimetiltriptamina (DMT) (Blackledge 2003). O cipó, conhecido popularmente como Mariri, é nativo das zonas tropicais da América do Sul e das Antilhas, possui β -carbolinas responsáveis pela inibição reversível da enzima monoaminoxidase do tipo A (Callaway e Grob 1998 citado por Pires et al. 2010).

Via oral os efeitos do decocto são perceptíveis aproximadamente em uma hora, sendo menos intensos que os efeitos produzidos pela administração via parenteral ou respiratória, possuindo uma duração de aproximadamente

quatro horas (Brito 2004).

Historicamente uma grande variedade de povos indígenas fazia uso ritualístico de várias substâncias alucinógenas, no entanto, cerca de 70 tribos distintas da Amazônia fazem o uso da ayahuasca, que com o decorrer do tempo passou a ser utilizado por civilizações de vilarejos nos estados brasileiros do Acre e de Rondônia, principalmente quando da imigração de trabalhadores para a prática do extrativismo da borracha na região Norte (Monteiro 1983; Labate e Araújo 2002).

O consumo religioso no Brasil é amparado por lei (BRASIL 2004) e a reelaboração das antigas tradições indígenas (Labate 2004; Lima 2004) acabou por promover a difusão dos rituais para outros países, tais como: Austrália, África do Sul, Canadá, França, Espanha, Estados Unidos, Japão e Holanda (Labate e Feeney 2012; Blainey 2014). Após a regularização do uso da ayahuasca para finalidades religiosas, a liberdade para realização do uso ritualístico possibilitou a expansão para além da cultura indígena, ocasionando o aumento significativo de adeptos (Callaway et al. 1994).

São poucos os dados e as informações pré-clínicas e clínicas, sobre o uso contínuo da ayahuasca, que forneçam uma base científica sólida em relação a segurança de sua utilização (Barker et al. 2001; McKenna 2004), porém, evidências demonstram os benefícios no âmbito psicoterapêutico, sua eficácia junto ao tratamento do etilismo crônico e do uso de outras drogas de abuso, além de mudanças em estados comportamentais de ansiedade, alienação, agressividade, dentre outros (Grob et al. 1996; Halpern 1999; Stuckey et al. 2005; Celeste 2010).

O uso ritualístico dos vegetais tem se expandido, nos últimos anos, além da cultura indígena, abrindo espaço para movimentos religiosos que têm como objetivo a busca de modificações morais através da facilitação da introspecção e o alcance do autoconhecimento (Callaway et al. 1994).

Objetivou-se determinar a qualidade de vida e os níveis de esperança de indivíduos de uma comunidade religiosa Ayahuasqueira que tiveram experiência prévia com o uso abusivo de substâncias químicas. Também considerou-se avaliar o nível de esperança mediante o abandono da adicção e a manutenção de estados sóbrios, analisou-se parâmetros hematológicos e a percepção destes mediante as intervenções propostas pela pesquisa.

Materiais e métodos

Trata-se de um estudo observacional e exploratório do tipo relato de casos. A amostra foi constituída por um total de seis indivíduos, quatro homens e duas mulheres, que já utilizaram algum tipo de substância lícita ou ilícita de forma abusiva, todos membros de uma Comunidade Ayahuasqueira situada no município de Ouro Preto do Oeste, interior do estado de Rondônia, Brasil.

Os voluntários foram informados sobre a proposta do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os dados que os caracterizam como participantes foram obtidos a partir da realização de uma entrevista de caráter informal e por pauta, contando com gravação de áudio. A qualidade de vida foi avaliada pelo questionário validado em português, o Short Form-36 (SF-36). A avaliação da esperança foi realizada por meio da metodologia de HERT (Cristina e Aurora 2008). A satisfação dos participantes foi avaliada por escala visual analógica desenvolvida para o intuito (EVA-S), estas foram entregues separadamente com instruções explicativas para manutenção da sigiliosidade (figura 1). Este instrumento oferece um score de 0 a 10, pior e o melhor valor, respectivamente. No final os resultados foram convertidos em frequência relativa para melhor interpretação dos dados.

Para determinar o perfil hematológico coletou-se 5 ml de sangue, a amostra foi acondicionada em tubos que foram transportados a temperatura média de 5°C para análise em laboratório clínico particular, considerou-se a determinação dos seguintes parâmetros: hemoglobina (HGB),

volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Considerações éticas

O trabalho foi aprovado pelo parecer número 481.398 do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná (CEULJI/ULBRA), estado de Rondônia, norte do Brasil, mediante autorização prévia do responsável pelo local de estudo.

Análises estatísticas

Para análise dos dados foi utilizado o software Microsoft® Excel, e teste de Wilcoxon Signed Rank Test através do programa SPSS 20.0, considerando nível de significância ($p \leq 0,05$), para todos os testes.

Resultados

Para obtenção do valor de p para cada dimensão ou parâmetro observado nos questionários e exames hematológicos utilizou-se o teste de Wilcoxon Signed Rank, no qual para a amostra inicial foi utilizado o valor da média do escore proposto para cada questionário e a média para os valores de referência de adultos nos exames hematológicos. A obtenção de tais valores se deu pela soma do menor e maior escore dividido por dois. Para tais valores encontrou-se: Questionário Qualidade de Vida (SF-36) 50; Escala de Esperança de HERT (EEH) 30; Hemoglobina (HGB), 15; Volume Corpuscular Médio (VCM) 88,5; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), 29,1 e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) igual a 33,6.

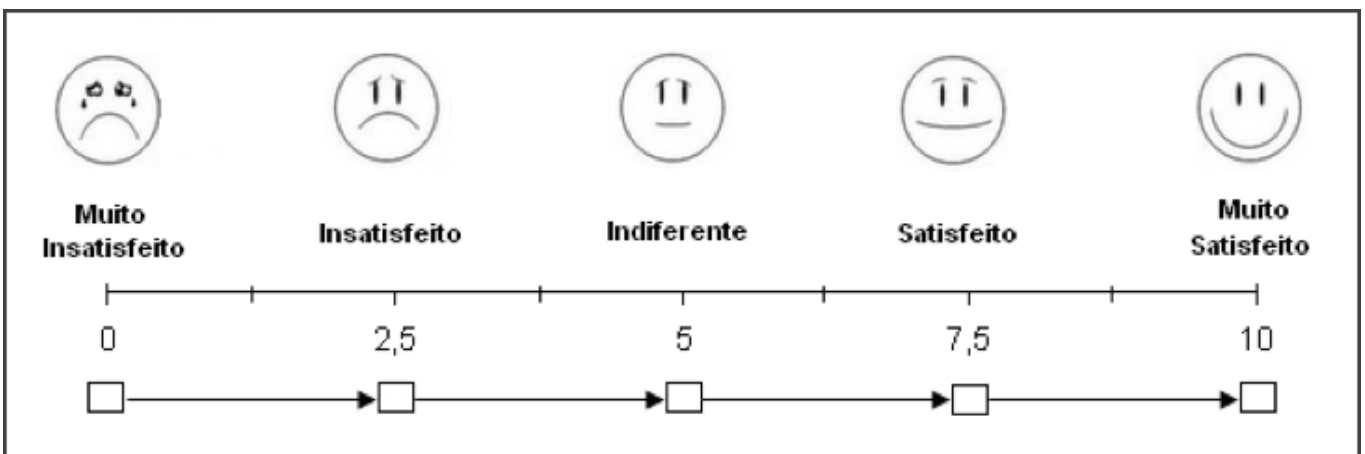


Figura 1. Escala visual analógica aplicada pra a satisfação (EVA-S)

Entrevistas

As palavras textuais das entrevistas encontram-se em itálico, sendo que apenas os trechos de maior importância foram comentados. Os participantes consideraram o uso ritualístico da Ayahuasca uma forma de tratamento e acreditavam que poderão abandonar a adicção ou se manter sóbrios, houve aqueles que atribuíram o abandono da dependência química à Ayahuasca.

Fato comum expresso pelos indivíduos foi o relato de que o chá tem a capacidade de mostrar o erro, ou seja, de mostrar o que a pessoa está fazendo de errado e o que é necessário mudar.

João (nome fictício): *“Eu digo que o vegetal ensina, ele mostra aquilo que tem guardado, mostrando tudo àquilo que fizemos de errado e já esquecemos e outras coisas recentes”.*

A maioria dos participantes definiu o período de drogadição em suas vidas como um período muito ruim, como tempo perdido.

Maria (nome fictício): (...) *“Hoje eu penso assim: eu perdi muito tempo da minha vida, esse tempo que eu passei, assim, usando bebida alcoólica, fumando, pra mim foi um tempo perdido, foi o pior tempo da minha vida”.*

Quando questionada sobre uma melhora na saúde após o início do uso ritualístico da ayahuasca Maria relatou:

“Muito grande, inclusive eu tinha muito problema com estômago, porque o álcool e o cigarro causam esse tipo de problema e eu também tomava muito medicamento para depressão (...) depois que eu comecei a tomar o chá eu não sinto mais nada e também contra insônia eu me sinto bem, eu durmo e acordo disposta, não sou mais aquela pessoa que quando estava só no remédio antidepressivo eu acordava, mas acordava querendo cair por qualquer canto”.

Por meio das falas os participantes relataram que a partir do momento em que começara a fazer o uso ritualístico do decocto não sentiram o desejo de utilizar nenhuma substância química.

Suzana (nome fictício): *“Nesses três meses que eu estou aqui, no primeiro mês eu senti os efeitos da abstinência, aí eu comecei a beber o chá e agora passou”.*

Roberto (nome fictício): *“Do primeiro dia em que eu bebi, eu parei automaticamente de usar droga. (...) Não entrei mais, em momento nenhum eu senti o desejo. (...) Foi um choque na minha memória, me fez recordar de quem eu sou, de quem eu era, me mostrou que eu não era aquilo, mostrou o que eu não estava conseguindo enxergar”.*

Quando questionados sobre os tipos de drogas que já utilizaram obteve-se como resultado uma maior prevalência no uso de álcool, utilizado por todos os indivíduos, seu percentual foi de 27 % em relação as demais drogas utilizadas, a cocaína, utilizada por 5 indivíduos, correspondeu ao 23 %, a maconha e o tabaco corresponderam cada uma a um percentual de 18 % e foi utilizada por 4 indivíduos, o crack foi utilizado por 3 indivíduos e seu percentual em relação as demais drogas foi de 14 %.

Qualidade de vida (SHORT FORM - 36)

Utilizado em diversos ensaios clínicos, o questionário é composto por 8 dimensões, sendo elas: capacidade funcional, limitação por aspectos físicos, dor, estado geral de saúde, vitalidade; aspectos sociais, limitação por aspectos emocionais e saúde mental.

Na Tabela 1 encontram-se os valores dos escores alcançados pelos participantes do estudo. O desvio padrão demonstra que para cada parâmetro observado houve diferentes pontuações alcançadas, para cada indivíduo, em relação à média de todos os participantes do estudo. Desse modo observa-se que os participantes tiveram como resultado uma menor variação de pontuação no parâmetro relacionado à vitalidade, onde o valor médio obtido foi de $52,5 \pm 18,09$, e uma maior variação em relação à limitação por aspectos físicos, $50 \pm 47,43$. Tal achado implica que boa parte da população estudada alcançou níveis de vitalidade próximos.

Ao observar os demais parâmetros nota-se uma alternância dos valores referentes ao desvio padrão, de modo que para as dimensões analisadas há uma considerável alternância de um indivíduo para outro, demonstrando assim a diferença na qualidade de vida encontrada em cada participante.

Por meio das análises, as dimensões que avaliam a capacidade funcional e a limitação por aspectos emocionais apresentaram valores estatisticamente significativos em relação à

Tabela 1. Valores de maior e menor escore, média, desvio padrão e valor de *p*, obtidos através do questionário SF-36.

Domínios	Maior score	Menor score	Média	Desvio Padrão	Valor de p
Capacidade funcional	100	3584,	16	24,78	0,046
Limitação por aspectos físicos	100	0	50	47,43	0,672
Dor	84	22	47,33	22,44	0,753
Estado geral de saúde	75	10	59,83	24,79	0,344
Vitalidade	70	25	52,5	18,09	0,833
Aspectos sociais	100	25	69,58	28,08	0,078
Limitação por aspectos emocionais	100	33,3	66,65	36,53	0,024
Saúde mental	100	32	72,66	23,92	0,075

Tabela 2. Valores encontrados para os níveis de esperança.

Indivíduos (n)	Maior score	Menor score	Média	Desvio Padrão	Valor de p	
EEH	6	43	36	40,17	2,48	0,028

EEH = Escala de Esperança de Herth.

média do escore proposta pelo questionário. Os valores obtidos para tais dimensões foram: capacidade funcional $p=0,046$ e limitação por aspectos emocionais $p=0,024$.

Escala de Esperança de HERT (EEH)

Os valores encontrados, presentes na *tabela 2*, refletem uma média significativa ($p<0,05$) relacionada às perspectivas dos participantes na descontinuidade ou interrupção do uso abusivo de substâncias químicas. Tal evidência confirma o que fora registrado nas entrevistas. A *Figura 2* indica que as variáveis dos escores alcançados refletem o alto nível de esperança expresso por cada indivíduo, sendo o maior escore de 43 pontos e o menor de 36 pontos, ambos escores estão acima da média proposta pelo questionário.

Escala visual analógica para satisfação (EVA-S)
Dentre as definições propostas para a autodeclaração sobre a experiência em participar da pesquisa, no ambiente de suas práticas religiosas, a grande maioria dos indivíduos (83,3 %) demonstrou-se muito satisfeita, sendo que apenas um indivíduo (16,7 %) declarou-se satisfeito.

Parâmetros hematológicos

A média dos valores de referência utilizados para obtenção de *p*, para cada parâmetro, foi de hemoglobina=15,15 g/dl; Volume Corpuscular Médio=88,5 fl; Hemoglobina Corpuscular Média=29,1 pg; Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média=33,6 %.

Por meio dos valores obtidos em relação à média dos valores de referência observa-se que as os parâmetros volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$) quando comparados com a média dos valores de referência. Já os parâmetros hemoglobina (HGB) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram valores estatisticamente significativos, demonstrando desse modo que o uso ritualístico da ayahuasca não causou alterações em tais parâmetros (*tabela 3*).

Discussão

Observou-se uma forte carga emocional e cognitiva nos depoimentos, provavelmente oriunda da somatização das experiências anteriores, todos demonstram intento de mudanças e restauração de valores interrompidos pela adicção. Estes achados podem ter sido alcançados devido ao estado de introspecção induzido após o uso da infusão, conforme Pahlano-Fontes *et al.* (2015) há redução das atividades e conexões de centros da rede neural do modo padrão, ativada quando há o repouso ou a divagação, sem interferência significativa na rede da tarefa positiva, ativada em tarefas orientadas. Ideia sustentada por experiência semelhante realizada em 1960, com o LSD-25, onde teve-se como objetivo alcançar uma mudança radical de valores, filosofia de vida e atitudes perante os outros, o mundo e consigo mesmo, no estudo em questão dentre os objetivos propostos muitos foram atingidos (Grof 2001).

Ao considerar que a adicção é uma doença que perturba as funções biológicas, essenciais à neuroquímica, observa-se que a população

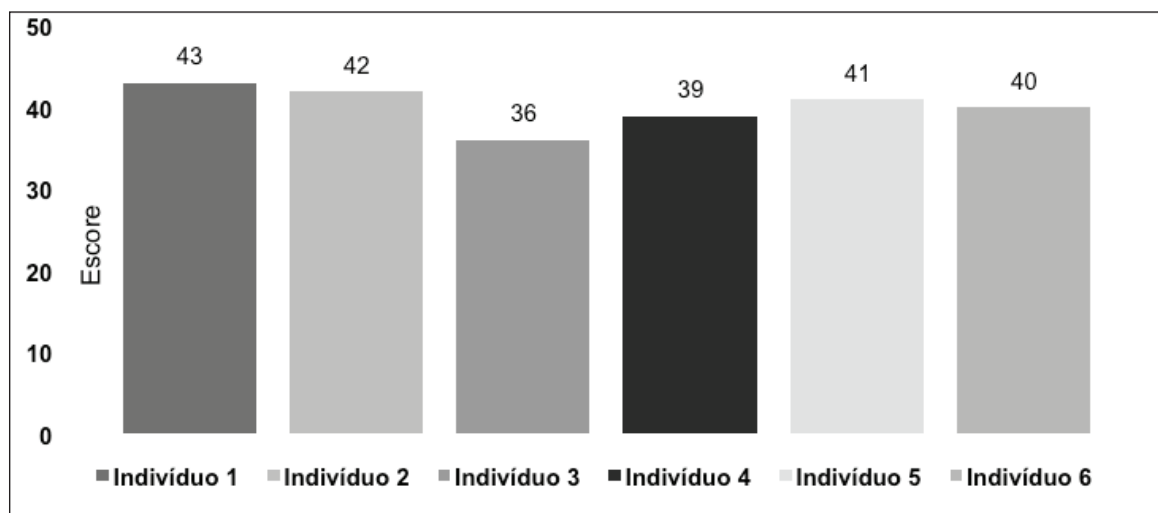


Figura 2. Resultados individuais relacionados à esperança na manutenção da descontinuidade do processo de adicção mediante à prática da atividade ritualística.

Tabela 3. Resultados dos exames hematológicos.

Parâmetros	INDIVÍDUOS						*IVR	Média	*Desv Pad	Valor de p
	1	2	3	4	5	6				
HGB (g/dL)	15,6	15,6	14,0	13,1	13,8	12,0	12,2-18,1	14,02	1,41	0,304
VCM (μm^3)	91,4	92,7	97,2	94,0	91,4	90,2	80-97 92,82	2,51	0,002	
HCM (pg)	30,5	29,8	30,6	29,0	29,7	26,7	27-31,2	29,38	1,44	0,305
CHCM (%)	33,3	32,2	31,5	30,9	32,5	29,6	31,8-35,4	31,67	1,31	0,002

Abreviaturas utilizadas: HGB=Hemoglobina; VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; CHCM=Concentração de hemoglobina corpuscular média. Descritores abreviados: *IVR=Intervalo dos valores referenciais para mulheres e homens adultos; *Desv Pad=desvio padrão.

apresentou escores com valores acima da média em 7 das 8 dimensões do SF-36, obtendo maiores escores nas dimensões que avaliam a capacidade funcional e a saúde mental. Inferiu-se que o uso ritualístico da Ayahuasca proporcionou aos participantes uma boa qualidade de vida o que condiz com a busca pessoal pela cura e pelo equilíbrio (Barbosa 2009; Han *et al.* 2010).

Os dados obtidos pela EEH apontam que todos os indivíduos apresentaram um alto nível de esperança mediante o abandono ou interrupção do uso abusivo de substâncias químicas. Estudos descrevem a esperança como um importante papel para avaliar uma população mediante um tratamento ou uma doença. Altos escores também foram encontrados em pacientes com *Diabetes mellitus* do tipo 2 e pacientes oncológicos, com doença inicial ou

metastática (Cristina e Aurora 2008). Orlandi e Praça (2013) evidenciaram a efetividade da escala de EEH na identificação de altos níveis de esperança, relacionando ainda a fé como conforto, discutindo e distinguindo os conceitos de espiritualidade e religiosidade em mulheres com HIV/AIDS.

O contentamento dos participantes, mediante os dados da EVA-S, reflete um resultado positivo após a experiência de reviver momentos e sentimentos pretéritos durante as entrevistas, bem como, com a aceitação da presença dos pesquisadores no ambiente em que a comunidade fora desenvolvida.

Em complicações decorrentes do alcoolismo são frequentes os quadros de anemia devido aos problemas nutricionais que levam a carência do ácido fólico ou a deficiência de folato em indivíduos que fazem uso de bebidas des-

tiladas. Em casos de anemia megaloblástica, decorrentes da deficiência de folato, os valores encontrados no hemograma são de hemoglobina (<12 g/dl para mulheres e <13 g/dl nos homens) e o VCM é elevado (> de 100 μm^3). A anemia ferropriva em etilistas geralmente é consequente a sangramentos gastrintestinais, identificam-se baixos valores de VCM (< de 80 μm^3) e de CHCM (< de 32g/dl). Os valores obtidos neste estudo indicam não haver alterações em nenhum dos parâmetros hematológicos investigados, demonstrando, deste modo, que o uso da Ayahuasca não apresentou influência tal como as ações metabólicas do álcool (Maio *et al.* 2000).

A dependência química é de fato um problema social crescente, onde as alternativas relacionadas às políticas públicas desempenham importante papel, todavia o sucesso do tratamento depende da complexidade de diferentes fatores envolvidos. Intervenções como tratamento de quadros de adicção necessitam de fontes externas de reforço (Higgins *et al.* 1994; Vuchinich 1996).

A utilização de substâncias químicas para atenuar ou tratar quadros de dependência é uma estratégia possivelmente mais aceita do que o uso da infusão dos vegetais, parte pela falta de informação e parte pelos pré conceitos relacionados à liberdade religiosa. Oliveira-Lima e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram em ratos a diminuição de comportamentos precoces relacionados ao início e ao desenvolvimento do alcoolismo, além disso, registrou-se a reversão da expressão dos efeitos crônicos com a interrupção da sensibilização comportamental, normalmente induzida pelo etanol.

Estudo realizado em São Paulo observou uma relação entre a diminuição da intensidade de sintomas psicopatológicos e a melhora da qualidade de vida (SF-36) através do uso ritualístico da Ayahuasca (Barbosa *et al.* 2009), mudanças psicológicas e comportamentais positivas também foram significativamente registradas, através da avaliação da esperança e da qualidade de vida, por Thomas *et al.* (2013) que consideraram o uso cerimonial da Ayahuasca um instrumento terapêutico justificado, em uma comunidade rural no Canadá.

Ao se analisar a problemática da adicção e os esforços das autoridades mundiais em definir formas efetivas de tratamento, considera-se a o uso da ayahuasca uma alternativa a ser discutida, uma vez que, além dos benefícios

evidenciados também se trabalha a espiritualidade e a religiosidade dos adeptos. Todavia, ressalta-se a necessidade de mais estudos para se considerar os fatores que influenciam o metabolismo dos vegetais, as técnicas de preparo e a padronização posológica para a determinação dos riscos/benefícios do uso crônico do decocto.

Bibliografia citada

American Society of Addiction Medicine (ASAM). Public Policy Statement: Definition of Addiction [on-line]. 2011. [consulta 06 de Junho 2013]. Disponível em: www.asam.org/research-treatment/definition-of-addiction.

Barker S.A., Littlefield-chaubaud M.A., David C. Distribution of the hallucinogens N,N-dimethyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in rat brain following intraperitoneal injection: application of a new solid-phase extraction LC-APCI-MS-MS isotope dilution method. *Journal of Chromatography B*. 2001;751(1):37-47.

Barbosa P.C.R.M. Cazorla I.M., Giglio J.S., Strassman R. A six-month prospective evaluation of personality traits, psychiatric symptoms and quality of life in ayahuasca-naïve subjects. *J Psychoactive Drugs*. 2009;41(3):205-12.

Blackledge R.D., Taylor C.M. Psychotria Viridis - A Botanical Source of Dimethyltryptamine (DMT). *Microgram J*. 2003;1(1):18-22.

Blainey, M.G. Forbidden Therapies: Santo Daimé, Ayahuasca, and the Prohibition of Entheogens in Western Society. *J Relig Health*. 2014.

BRASIL. Conselho Nacional de Política Sobre as Drogas. Resolução nº 1, de 25 de Janeiro de 2010. *Diário Oficial da União*. Dispõe sobre a observância, pelos órgãos da Administração Pública, das decisões do Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas - CONAD sobre normas e procedimentos compatíveis com o uso religioso da Ayahuasca e dos princípios deontológicos que o informam [on-line]. Brasília (DF); 2010. [consulta 10 de Junho de 2014]. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftp-sessp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.jan.10/iels16/U_RS-CONAD-1_250110.pdf.

BRASIL. Secretaria Nacional Sobre Consumo de Drogas Psicotrópicas. VI Levantamento

Nacional Sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio de Redes Públicas e Privadas de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras [on-line] Brasília: 2010, p-84-93 [consulta 10 Junho de 2013]. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Publicacoes/328890.pdf>.

Brito G.S. Farmacologia humana da hoasca (chá preparado de plantas alucinógenas usado em contexto ritual no Brasil). Em: Labate B.C. O uso ritual da Ayahuasca. Campinas: Mercado de Letras Edições e Livraria; 2004. p. 623-71.

Callaway J.C. Airaksinen M.M., McKenna D.J., Brito G.S., Grob C. S. Platelet serotonin uptake sites increase in drinkers of Ayahuasca. *Psychopharmacology*. 1994;116(1):385-387.

Celeste E. Potent jungle vine brew has potential to treat addiction. *Voice of America*. [on-line]. 2010. [consulta em 24 de setembro de 2013]. Disponível em: <http://www.voanews.com/english/news/health/Potent-Jungle-Vine-Brew-Has-Potential-to-Treat-Addiction-88923322.html>.

Costa R.A., Santos C.E. A experiência da toxicomania e da reincidência a partir da fala dos toxicômanos. *Estudos de Psicologia (Campinas)*. 2007;24(4):487-502.

Cristina A.S.B., Aurora S.A.G. Escala de Esperança de Herth- Instrumento adaptado e validado para a língua portuguesa. *Ver Esc Enferm USP*. 2008;42(2):227-32.

El-Guebaly N., Mudry T., Zohar J., Tavares H., Potenza M.N. Compulsive features in behavioral addictions: The case of pathological gambling. 2012;107(10):1726-1734.

Grant B.F., Hasin D.S., Chou S.P., Stinson F.S., Dawson D.A. Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(11):1107-1115.

Grob C.S., McKenna D.J., Callaway J.C., Brito G.S., Neves E.S., Oberlaender G., Saide O.L., Labigalini E., Tacla C., Miranda C.T., Strassman R.J., Boone K.B. Human Psychopharma-

cology of Hoasca, a Plant Hallucinogen Used in Ritual Context in Brazil. *J Nerv Ment Dis*. 1996;184(2):86-94.

Grof S. Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies. LSD-Assisted Psychotherapy for Anxiety. [on-line]. Sarasota, Florida. 2001. [consulta em 23 de Fevereiro de 2014]. Disponível em: <http://www.maps.org/research/psilo-lsd/>.

Halpern J.H., Pope H.G. Jr. Do hallucinogens cause residual neuropsychological toxicity? *Drug Alcohol Depend*. 1999;53 (3):247-56.

Han D.H., Kim D.H., Lee Y.S., Min, K.J., Renshaw P.F. Changes in cue-induced, prefrontal cortex activity with video-game play. *Cyberpsychol Behav Soc Netw*. 2010;13(6):655-661.

Higgins S.T., Budney A.J., Bickel W.K., Foerg F.E., Donham R., Badger G.J. Incentives improve outcome in outpatient behavioral treatment of cocaine dependence. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51(7):568-576.

Kaplan H.I., Sadock B.J. Biological Therapies. In *Comprehensive Textbook of Psychiatry – Behavioral Sciences/ Clinical Psychiatry*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p. 1001-1104.

Kessler D.A., Natanblut S.L., Wilkenfeld J.P. Lorraine C.C., Mayl S.L., Bernstein L.G.G., Thompson L. Nicotine addiction: a pediatric disease. *Journal of Pediatrics*. 1997;130(4):518-524.

Labate B.C., Feeney K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: Implications and challenges. *International Journal of Drug Policy*. 2012;(23):154-162.

Labate B.C., Araújo W.S. O uso Ritual da Ayahuasca. Mercado das Letras FAPESP, São Paulo, 2002.

Labate B.C. A literatura brasileira sobre as religiões ayahuasqueiras. Campinas: Mercado de Letras Edições e Livraria; 2004. p. 231-73.

Lima E.G.C. O uso ritual da Ayahuasca: da Floresta Amazônica aos centros urbanos. Monografia em Geografia Cultural, Universidade de Brasília. Brasília. 2004.

Maio R., Dichi J.B., Burini R.C. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. *Arq. Gastroenterol.* 2000;37(2):120-124.

McKenna D. Clinical investigations of the therapeutic potential of Ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacol Ther.* 2004;102(1):111-29.

Monteiro C.O. Palácio Juramidam – Santo Daimé: um ritual de transcendência e despoluição. Tese de Mestrado em Antropologia Cultural, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1983.

Oliveira-Lima A.J., Santos R., Hollais A.W., Gerardi-Junior C.A., Baldaia M.A., Wu-Silva R., Yokoyama T.S., Costa J.L., Malpezzi-Marinho E.L., Ribeiro-Barbosa P.C., Berro L.F., Frussa-Filho R., Marinho E.A. Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. *Physiol Behav.* 2015;142:28-36.

Orlandi F.S., Praça N.S. A esperança na vida de mulheres com HIV/AIDS: avaliação pela escala de HERTH. *Texto Contexto Enferm.* 2013;22(1):141-148.

Paladinho S.F. Alterações hematológicas ligadas ao alcoolismo [on-line] 2000. [consulta 31 de Outubro de 2013]. Disponível em: [http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol27/n1/artigo27\(36\).htm](http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol27/n1/artigo27(36).htm).

Palhano-Fontes F., Andrade K.C., Tofoli L.F., Santos A.C., Crippa J.A., Hallak J.E.C., Ribe-

iro S., Araujo D.B. The Psychedelic State Induced by Ayahuasca Modulates the Activity and Connectivity of the Default Mode Network [on-line]. *Plos one.* 2015;10(2). doi: 10.1371/journal.pone.0118143.

Pinho P.H., Oliveira M.A., Almeida M.M. A reabilitação psicossocial na atenção aos transtornos associados ao consumo de álcool e outras drogas: uma estratégia possível? *Rev Psiqu Clin.* 2008;35:82-8.

Pires A.P.S., Oliveira C.D.R, Yonamine M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2010;31(1):15-23.

Smith D.E. The evolution of addiction medicine as a medical specialty. *Virtual Mentor* [on-line]. 2011 Dez. [consulta 08 de Junho de 2013]; 13 (12): 900–05. Disponível em: <http://virtualmentor.ama-assn.org/2011/12/mhst1-1112.html>.

Stuckey D.E., Lawson R., Luna L.E. EEG gamma coherence and other correlates of subjective reports during Ayahuasca experiences. *Journal of Psychoactive Drugs.* 2005;37(2):163-78.

UNODOC, United Nations Office of Drugs and Crime [on-line]. The world drug report 2011. [consulta 10 de Abril de 2014]. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR-2011.html>

Vuchinich R.E., Tucker J.A. The molar context of alcohol abuse. In: L. Green, & J. Kagel (Eds.), *Advances in behavioral economics*, vol. 3 (pp. 133–162). 1996.

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

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.