

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 23
N° 2
Septiembre 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. Donnerwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

Gina D'Suze, *IVIC, Venezuela*

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

Veniero Gambaro, *Università di 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 genotoxicidad a través de la frecuencia de Micronúcleos en eritrocitos de *Piaractus mesopotamicus* (pacúes) expuestos in vivo a nanopartículas de plata
Davico, Carla; Bacchetta, Carla; López, Gerardo; Cazenave, Jimena; Poletta, Gisela; Simoniello, M. Fernanda 73

Reportes de casos

Convulsiones por isoniazida: una causa toxicológica a considerar
Díaz, Mariano; Lamenza, Claudía; Trapassi, Horacio; Cargnel, Elda; Mandolesi, Graciela; Cardoso, Patricia .. 79

Intoxicación por *Datura stramonium*: serie de tres casos
Saracco, Aldo Sergio; Lima, Cristian O. 83

Comunicaciones breves

Fermentação em estado sólido de *Aspergillus parasiticus* e produção de aflatoxinas
Domingues, Jéssica Mari; Carneiro Gomes, Eliane; Brand, Debora; Wagner, Ricardo 89

Instrucciones para los autores 96

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

Evaluación de genotoxicidad a través de la frecuencia de Micronúcleos en eritrocitos de *Piaractus mesopotamicus* (pacúes) expuestos *in vivo* a nanopartículas de plata

Assessment of genotoxicity by Micronucleus frequency in *Piaractus mesopotamicus* erythrocytes exposed to silver nanoparticles *in vivo*

Davico, Carla¹; Bacchetta, Carla^{2,5}; López, Gerardo³; Cazenave, Jimena^{2,4,5}; Poletta, Gisela^{1,5}; Simoniello, M.Fernanda^{1*}

¹Cát. Toxicología, Farmacología y Bioq. Legal Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina. ²Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL). Ciudad Universitaria UNL Santa Fe, Argentina (3000). ³Nanotek S.A. ⁴Facultad de Humanidades y Ciencias. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina. ⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. Rivadavia 1917 (C1033AAJ). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

*fersimoniello@yahoo.com.ar

Recibido: 29 de septiembre de 2015

Aceptado: 5 de octubre de 2015

Resumen. El uso creciente de nanomateriales en productos industriales y de consumo ha incrementado la preocupación mundial respecto a sus posibles efectos adversos en los sistemas biológicos. Como consecuencia de la falta de un marco legislativo y la ausencia de un consenso sobre los protocolos experimentales, las investigaciones ecotoxicológicas se llevan a cabo a un ritmo mucho más lento que la producción de nuevas nanopartículas. Por esta razón, existe una necesidad creciente de realizar estudios que aporten conocimiento sobre el riesgo de estos contaminantes emergentes de propiedades únicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de ejemplares juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) expuestos a nanopartículas de plata (Nano-Ag) a las concentraciones de 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (control); 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, durante 24 horas. Se observó que la FMN se incrementó significativamente ($p < 0,01$) en la concentración de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos expuestos a 2,5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el control. Estos resultados sugieren que los eventos aneugénicos o clastogénicos podrían representar un posible mecanismo de toxicidad de Nano-Ag en esta especie.

Palabras claves: Peces; Nanomateriales; Micronúcleos, Genotoxicidad

Abstract. The growing use of nanomaterials in consumer and industrial products has aroused global concern about possible adverse effects on biological systems. Due to the lack of a regulation framework and the absence of a consensus on the experimental protocols, ecotoxicological investigations are carried out much slower than the production of new nanoparticles. For this reason, there is a growing need for studies that provide knowledge about the risk of these emerging contaminants of unique properties. The objective of the present study was to evaluate the frequency of micronuclei (FMN) in erythrocytes of juvenile *Piaractus mesopotamicus* exposed to silver nanoparticles (nano-Ag; Nanotek SA) at concentrations of 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (control); 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, for 24 hours ($n = 10$ per treatment). The FMN show a significant increase ($p < 0.01$) in fish exposed to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of Nano-Ag, while there were no significant differences among the groups exposed to 2.5 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with the control. These results suggest that the aneugenic or clastogenic events may represent a possible mechanism of toxicity of Nano-Ag in this specie.

Keywords: Fishes; Nanomaterials; Micronucleus; Genotoxicity

Introducción

El uso creciente de nanomateriales (NM) en productos industriales y de consumo ha incrementado la preocupación mundial respecto a sus posibles efectos adversos en los sistemas biológicos (Savolainen y col. 2010). Como consecuencia de la falta de un marco legislativo y la ausencia de un consenso sobre los protocolos experimentales, las investigaciones eco-

toxicológicas se llevan a cabo a un ritmo mucho más lento que la producción de nuevas nanopartículas. Por esta razón, existe una necesidad creciente de realizar estudios que aporten conocimiento sobre el riesgo de estos contaminantes emergentes de propiedades únicas (Dhawan y Sharma 2010). Si bien las perspectivas de utilidad de los NM en áreas como la

medicina y la energética son prometedoras, las propiedades que los hacen atractivos también contribuyen a su perfil toxicológico (Landsiedel y col. 2009).

Entre los NM más prometedores con propiedades antibacterianas se encuentran las Nanopartículas de plata (Nano-Ag), que exhiben una mayor actividad química debido a su relación superficie-volumen y estructura cristalográfica (Flower y col. 2012). Sin embargo, el rápido incremento en la producción de estas nanopartículas ha derivado en un aumento potencial de la exposición del hombre y el medio ambiente (Chen y Schluesener 2008). A pesar de su uso generalizado, hay datos limitados sobre la seguridad, toxicología y vías posibles de exposición a Nano-Ag, siendo aún menos numerosos los trabajos que investigan su posible interacción con el ADN. Se han propuesto una variedad de mecanismos para explicar la toxicidad de Nano-Ag, incluyendo la interacción con las membranas celulares (Sondi y Salopek-Sondi 2004; Morones y col. 2005), citotoxicidad (Braydich-Stolle y col. 2005, Chae y col. 2009; Taju y col. 2013), apoptosis (Hsin y col. 2008; Choi y col. 2010), inducción de especies reactivas del oxígeno (EROS) (He y col. 2012; Van Aerle y col. 2013) y la interacción de los iones Ag⁺ con las proteínas y/o enzimas celulares (Matsumura y col. 2003; Morones y col. 2005; Choi y col. 2009).

Debido a sus características físico-químicas, los NM pueden tener propiedades genotóxicas impredecibles. Pueden causar daños en el ADN indirectamente, mediante la promoción de estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria. Alternativamente, al ser suficientemente pequeñas, pueden atravesar las membranas celulares y tener acceso al núcleo, donde pueden interactuar directamente con el ADN, causando daño a la molécula (Singh y col. 2009).

Los efectos genotóxicos de los contaminantes pueden ser monitoreados utilizando el Ensayo de micronúcleos (MN), siendo éste una de las pruebas más ampliamente utilizadas en las evaluaciones genotóxicas debido a la sensibilidad en la detección de daño en el material genético y su rápida realización (Cavas y Könen 2007). Por su parte, el ensayo de MN ha sido ampliamente utilizado en peces para evaluar el daño al ADN generado por contaminantes en el agua, tanto en condiciones de laboratorio como a campo (Al-Sabti y Metcalfe 1995; Minissi y col. 1996; Hayashi y col. 1998).

La utilización de peces como bioindicadores

puede ayudar a detectar posibles problemas en el medio ambiente. Resultados obtenidos en ensayos con peces pueden ser útiles para la evaluación de los posibles efectos en la salud de otros organismos de sustancias potencialmente tóxicas presentes en el medio ambiente (Matsumoto y col. 2006).

Piaractus mesopotamicus (Pisces, Characidae) es un pez sudamericano, ampliamente utilizado en el cultivo de peces debido a su fácil manejo y buena velocidad de crecimiento (Jomori y col. 2003). Se lo encuentra naturalmente en aguas continentales de Argentina y países limítrofes de la Cuenca del Plata, que comprende los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay (Ringuelet y col. 1967; Agostinho y col. 1997; Bechara y col. 1997; Hahn y col. 1997).

El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante el Test de MN las posibles modificaciones en el material genético de los eritrocitos de *P. mesopotamicus* causado por la exposición *in vivo* a nanopartículas de plata.

Materiales y métodos

Se obtuvieron 40 ejemplares juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) con una longitud estándar promedio de $8,1 \pm 0,5$ cm y un peso promedio de $23,9 \pm 4,4$ g de una granja de piscicultura local. Con el propósito de lograr su aclimatación, los peces se colocaron en tanques de 150 litros con agua dechlorada durante dos semanas. Se los alimentó una vez al día con *pellets* comerciales secos. La alimentación fue suspendida 24 horas antes del comienzo de las pruebas. Los juveniles fueron expuestos a una solución coloidal de Nano-Ag (Nanotek S.A.) a las concentraciones de $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (control); $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Luego de 24 horas de exposición, los ejemplares ($n=10$ por tratamiento) fueron sacrificados, extrayéndose sangre para analizar la Frecuencia de MN (FMN).

La caracterización de las nanopartículas de plata se llevó a cabo a través de microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes obtenidas a partir de una suspensión acuosa del producto mostraron partículas de forma esférica de un tamaño entre 20 y 25 nm (Figura 1). A través de espectrofotometría de absorción atómica, se constató la entrada y acumulación de plata total en hígado, cerebro y branquias de los peces expuestos a todas las concentraciones de Nano-Ag (Bacchetta y col. 2014).

La FMN se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descripta por Koppe-Grisolia y Torres-Cordeiro

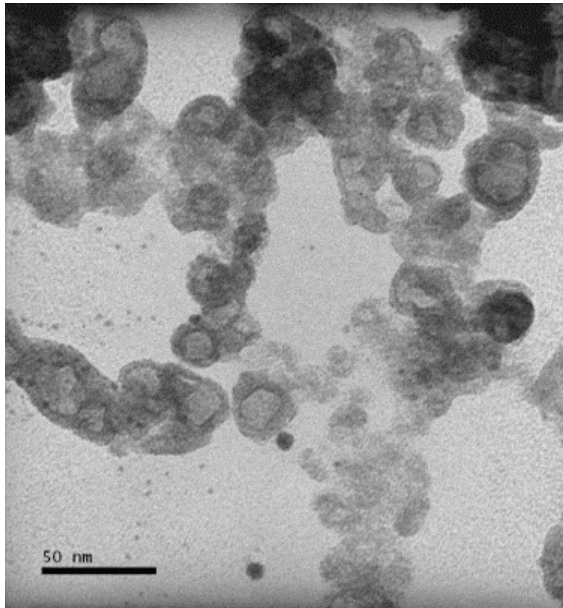


Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de Nano-Ag (Nanotek S.A.).

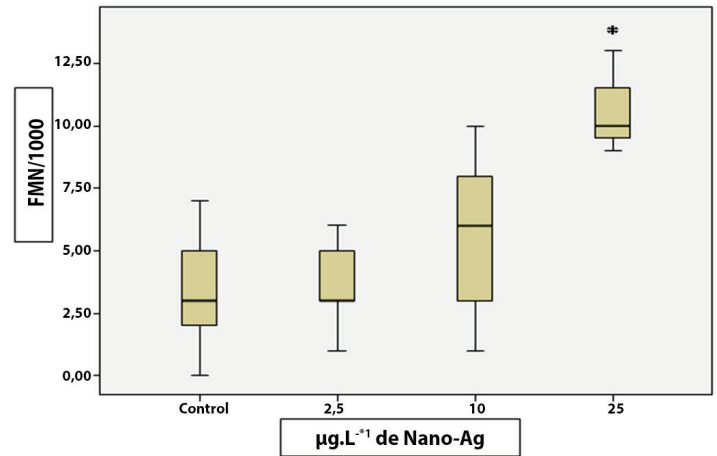


Figura 2. Box-Plot de los resultados obtenidos para la Frecuencia de Micronúcleos / 1000 eritrocitos de peces expuestos a diferentes concentraciones de Nano-Ag.

*Diferencia estadísticamente significativa respecto del control negativo ($p < 0,01$; Test de Mann-Whitney).

(2000). Cada muestra se realizó por duplicado. Los extendidos fijados fueron teñidos durante 10 minutos con Giemsa en una dilución 1:10, centrifugada y filtrada previamente para reducir la presencia de grumos de colorante, que pudieran interferir en la identificación de los MN. Por cada ejemplar se analizaron 1000 células (500 de cada preparado) bajo microscopio óptico con una magnificación de 1000X y se registró la FMN, definida como la cantidad de células que presentan MN por cada 1000 células contabilizadas. Los criterios para la identificación de los MN fueron los siguientes (Heddle 1973; Koppe-Grisolia 2002):

- 1) El tamaño del MN debe ser menor que un tercio del tamaño del núcleo principal.
- 2) El MN no debe solaparse con el núcleo principal y, si está en contacto con éste, los bordes de cada uno deben ser perfectamente distinguibles.
- 3) El MN debe poseer el mismo color e intensidad de tinción que el núcleo principal.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS 14.0 para Windows. Los datos fueron evaluados en normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y en homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. Se utilizó el test de Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney para comparar FMN entre los grupos expuestos y el control negativo.

Resultados

No se observaron cambios comportamentales evidentes ni mortalidad en los especímenes expuestos a las distintas concentraciones de Nano-Ag. Respecto a los grupos expuestos a Nano-Ag, se observó que la FMN se incrementó significativamente ($p < 0,01$) en la concentración de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,20 \pm 2,08$). Por el contrario, no hubo diferencia entre los grupos expuestos a 2,5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{FMN} = 0,52 \pm 1,64$ y $0,90 \pm 2,85$ respectivamente) respecto del grupo control ($\text{FMN} = 0,99 \pm 2,42$; $p > 0,01$; Figura 2).

Discusión

Estudios de laboratorio han informado acerca de la toxicidad de Nano-Ag para una amplia gama de organismos. Sin embargo, las concentraciones que causan efectos van desde algunos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que refleja que la especie testeada, tipo de partícula y condiciones de exposición son determinantes (Griffitt y col. 2008; Wu y Zhou 2013; McShan y col. 2014). Particularmente, informes anteriores muestran que las Nano-Ag pueden ser tóxicas para los peces. Farkas y col. (2010) indicaron citotoxicidad en cultivos primarios de hepatocitos de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a concentraciones de Nano-Ag de aproximadamente 20mg/L. En la misma especie, Joo y col. (2013) indicaron bioacumulación de plata en hígado, branquias y músculo luego de 14 días de exposición crónica a Nano-Ag.

Por otro lado, Griffitt y col. (2013) han investigado la exposición crónica a Nano-Ag en el pez cebra (*Danio rerio*), analizando alteraciones en la carga tisular, la morfología general de las branquias, y los perfiles de expresión génica global. Los autores reportaron que las Nano-Ag que se acumulan en las branquias no parecen generar alteraciones morfológicas observables en dicho tejido a nivel microscópico, a las concentraciones y duraciones de exposición analizados. Sin embargo, la exposición y/o acumulación de Nano-Ag indujeron alteraciones dramáticas en los perfiles globales de transcripción de genes en las branquias expuestas. Estos resultados fueron similares a los presentados anteriormente por los mismos investigadores en una exposición aguda (48hs) (Griffitt y col. 2009).

Investigaciones llevadas a cabo en salmónidos demuestran que las células de peces tienen una baja capacidad de reparación del ADN dañado y que debido a sus condiciones particulares de hábitat, son muchos más sensibles a daños genotóxicos producidos por contaminantes acuáticos que las células de anfibios, aves y mamíferos (Edwards y col. 1986). En el presente estudio, se observó un aumento significativo en la FMN para la concentración más alta ($25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Kim y col. (2013) llevaron a cabo el Ensayo Cometa y el test de MN para evaluar la genotoxicidad de Nano-Ag en células CHO-K1, y reportaron que Nano-Ag estimula la rotura del ADN y la formación de MN en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, en una intensa búsqueda bibliográfica, no se han encontrado hasta el momento informes que utilicen la FMN en peces expuestos in vivo a Nano-Ag.

Estos resultados sugieren que la FMN permite detectar precozmente (24 hs) efectos genotóxicos y que los eventos aneugénicos o clastogénicos podrían representar un posible mecanismo de toxicidad de Nano-Ag en la especie estudiada.

Bibliografía citada

Agostinho A.A., Hahn N.A., Gomes L.C., Bini L.M. Estructura trófica. En: Vazzoler A.E., Agostinho A.A., Hahn N.S. A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil. 1997. p.229-248.

Al-Sabti K. y Metcalfe C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995;343:121-135.

Bacchetta C., Gervasio S.G., Rossi A., Ale A., Campana M., López G., Parma M.J., Monseprat, J.M., Cazenave J. Toxicidad de nanopartículas de plata: bioacumulación y estrés oxidativo en peces. *Biología Acuática.* 2014;29:94-95.

Bechara J.A, Varela M.E., Martínez M.C. Evaluación empírica de la tasa de consumo de invertebrados y de alimento complementario en juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista de Ictiología.* 1997;5:23-25.

Braydich-Stolle L., Hussain S.M., Schlager J.J., Hofmann M. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* 2005;88(2):412-419.

Cavas T., Könen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis.* 2007;22(4):263-8.

Chae Y.J., Pham C.H., Lee J., Bae E., Yi J., Gu M. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 2009;94:320-7.

Chen X. y Schluesener H.J. Nano-silver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 2008;176:1-12.

Choi J.E., Kim S., Ahn J.H., Youn P., Kang J.S., Park K., Yi J., Ryu D.Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2010;15(100):151-159.

Choi O., Clevenger T.E., Deng B., Surampalli R.Y., Ross L., Hu Z. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res.* 2009;43:1879-86.

Dhawan A., Sharma V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal Bioanal Chem.* 2010;398:589-605.

Edwards R., Millburn P., Hutson D.H. Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986;84(3):512-522.

Farkas J., Christian P., Urrea J.A., Roos N., Hassellöv M., Tollefsen K.E., Thomas K.V. Effects of

silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 2010;96:44-52.

Flower N.A.L., Brabu B., Revathy M., Gopalakrishnan C., Raja S.V., Murugan S., Kumaravel T.S. Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutat Res.* 2012;742:61-65.

Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. Comparison of molecular and histological changes in Zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2009;107(2):404-415.

Griffitt R.J., Lavelle C.M., Kane A.S., Denslow N.D., Barber D.S. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2013;130-131:192-200.

Griffitt R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.C., Barber D.S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(9):1972-1978.

Hahn N.S., Andrian I.F., Fugi R., Lescano de Almedia V.L. Ecología trófica. In: Vazzoler A.E., Agostinho A.A., Hahn N.S. A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil. 1997. p.209-228.

Hayashi M., Ueda T., Uyeno K., Wada K., Kinnae N., Saotome K., Tanaka N., Takai A., Sasaki Y.F., Asano N., Sofuni T., Ojima Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res.* 1998;399:125-133.

He D., Dorantes-Aranda J.J., Waite T.D. Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environ Sci Technol.* 2012;46:8731-8.

Heddle J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 1973;18:307-317.

Hsin Y.H., Chena C.F., Huang S., Shih T.S., Lai P.S., Chueh P.J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-de-

pendent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.* 2008;179(3):130-139.

Jomori R., Carneiro D.J., Malheiros E.B., Portella M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture.* 2003;221:277-287.

Joo H.S., Kalbassi M.R., Yu I.J., Lee J.H., Johari S.A. Bioaccumulation of silver nanoparticles in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. *Aquat Toxicol.* 2013;140-141:398-406.

Kim H.R., Park Y.J., Shin D.Y., Oh S.M., Chung K.H. Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. *Environ Health Toxicol.* 2013;28:1-8.

Koppe-Grisolia C. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin and various pesticides. *Mutat Res.* 2002; 518: 145-150.

Koppe-Grisolia C. y Torres-Cordeiro C.M. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet Mol Biol.* 2000;23(1):235-239.

Landsiedel R., Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations. Many questions, some answers. *Mutat Res.* 2009;681:241-258.

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

Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S., Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *App Environ Microbiol.* 2003;69(7):4278-4281.

McShan D., Ray P.C., Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal.* 2014;22:116-127.

Minissi S., Ciccotti E., Rizzoni M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutat Res.* 1996;367:245–251.

Morones J.R., Elchiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Miguel J.Y. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10):2346–2353.

Ringuelet, R.A., Arámburu R.H., Alonso de Arámburu A. Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigación Científica (CIC). La Plata, Provincia de Buenos Aires. 1967; 602 pp. p.

Savolainen K., Alenius H., Norppa H., Pylkkänen L., Tuomi T., Kasper G. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—a review. *Toxicology.* 2010;269:92–104.

Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G.G., Wright C.J., Doak S.H. NanoGenotoxicology: The DNA da-

maging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials.* 2009;30:3891–3914.

Sondi I. y Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004;275(1):177–182.

Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K.S.N., Sahul Hameed A.S. Development and characterization of cell line from the gill tissue of *Catla catla* (Hamilton, 1822) for toxicological studies. *Chemosphere.* 2013;90:2172–2180.

Van Aerle R., Lange A., Moorhouse A., Paszkiewicz K., Johnston B.D., Bastos E., Booth T., Tyler C.R., Santos E.M. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environ Sci Technol.* 2013;47:8005-14.

Wu Y. y Zhou Q. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(1):165-73.

REPORTES DE CASOS

Convulsiones por isoniazida: una causa toxicológica a considerar Isoniazid seizures: A toxicological cause to consider

Díaz, Mariano*; Lamenza, Claudia; Trapassi, Horacio; Cargnel, Elda; Mandolesi, Graciela; Cardoso, Patricia

Unidad de Toxicología-Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Gallo 1330, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Tel: 4962-6666/2247.
*marianotox@yahoo.com.ar, toxiguti@yahoo.com.ar

Recibido: 22 de mayo de 2014

Aceptado: 20 de septiembre de 2014

Resumen. La neurotoxicidad de la isoniazida (INH) frecuentemente no es tenida en cuenta por el pediatra ante un paciente con un cuadro convulsivo agudo. La INH es uno de los fármacos más indicados en el tratamiento y quimioprofilaxis de la tuberculosis. Habitualmente se la indica al grupo familiar, debido a las características epidemiológicas de esta enfermedad, lo cual permite una amplia disponibilidad en los hogares, pudiendo originar intoxicaciones accidentales o intencionales. La intoxicación severa se caracteriza por un cuadro neurotóxico agudo, expresado en un síndrome convulsivo o coma, que no cede con el tratamiento habitual. Se presenta un caso clínico de una paciente intoxicada grave con isoniazida, habiendo sido la anamnesis dirigida ampliada junto con un diagnóstico precoz y el tratamiento específico con el antídoto, la base fundamental para la evolución favorable de la paciente.

Palabras clave: Intoxicación; Isoniazida; Convulsiones; Acidosis metabólica.

Abstract. Pediatricians do not usually considered isoniazid (INH) neurotoxicity in cases of patients with severe seizure disorders. INH is one of the most suitable drugs in the treatment and chemoprophylaxis of tuberculosis. It is usually indicated to the family group, due to the epidemiological characteristics of this disease, allowing a wide availability in homes and being able to cause accidental or intentional poisoning. An acute neurotoxic picture, expressed as a convulsive syndrome or coma, which does not improve with the usual treatments, characterized severe intoxication. A case of a patient with severe intoxication with isoniazid is presented. The extended anamnesis, along with an early diagnosis and the specific antidote treatment, set the fundamental basis for the favorable evolution of the patient.

Keywords: Intoxication; Isoniazid; Seizure; Metabolic acidosis.

Introducción

La neurotoxicidad de la isoniazida (INH) habitualmente no es tenida en cuenta por el pediatra ante un paciente con un cuadro convulsivo agudo, siendo éste último, un motivo de consulta frecuente en el área de Emergencia. Entre los diagnósticos diferenciales, es importante tener en cuenta aquellos de origen tóxico.

La INH es uno de los fármacos más indicados en la tuberculosis (TBC) y esta enfermedad tiene cada vez más repercusión mundial en cuanto a su prevalencia, aumentando, por consiguiente, el número de personas bajo tratamiento con fármacos antituberculosos (Muñoz Aguilar 2013). Se estima en 8.600.000 el número de personas que desarrollaron TBC en

2012, siendo 1.100.000 portadores del virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH +).

Para el médico, es particularmente importante evaluar no sólo las complicaciones de la enfermedad en sí y los efectos adversos de la terapia, sino también el riesgo de una sobredosis con estos fármacos (accidental o intencional) (Hernon y Boyer 2011).

Debido a que la tuberculosis es un problema de Salud Pública de importancia en la Argentina, la mayor disponibilidad de INH en los hogares favorece la intoxicación con este fármaco. Se presenta el caso clínico con el objetivo de que el pediatra considere también a la intoxicación con fármacos entre los diagnósticos diferenciales, ante un paciente con convulsiones de

causa desconocida. La intervención médica e indicación oportuna del tratamiento específico, permitió la evolución clínica favorable.

Caso clínico

Una paciente de 15 años ingresó al Servicio de Emergencias acompañada por un familiar, por presentar en su hogar un episodio de convulsión tónico-clónica generalizada de aproximadamente 5 minutos de duración, posterior a la aparición de vómitos. Ingresó en buen estado general, hemodinámicamente compensada, lúcida, Glasgow 15/15.

El pediatra de guardia solicitó interconsulta a la Unidad de Toxicología debido a la sospecha de una exposición ambiental a monóxido de carbono. Los médicos de la Unidad descartaron la misma, pero ante una anamnesis dirigida ampliada surgió como antecedente patológico asociado, que la paciente se encontraba en tratamiento (profilaxis) desde hacía cinco meses con drogas antituberculosas (madre en tratamiento por tuberculosis). Ante la sospecha de una sobredosis del fármaco, se insistió en confirmar este diagnóstico y, posteriormente,

la paciente admitió haber ingerido en forma intencional 10 comprimidos de isoniazida de 300 mg, seis horas previas a su ingreso.

Se indicaron medidas de rescate: se realizó lavado gástrico, obteniéndose escaso material (restos de comprimidos) y se administraron carbón activado y purgante salino. Se solicitó laboratorio de ingreso, constatándose leucocitosis (glóbulos blancos: 15.200/mm³), acidosis metabólica con anión gap aumentado y acidemia (Tabla 1). En vista del antecedente de la ingesta y el cuadro clínico presentado, se decidió su internación, iniciándose tratamiento específico con piridoxina (vitamina B6), 3 gramos en infusión continua IV, a pasar en 1 hora.

Evolución: la paciente presentó buena tolerancia al tratamiento con el antídoto, no repitiendo nuevo episodio convulsivo, corrigiendo las alteraciones del laboratorio de ingreso (Tabla 1). Luego de una evolución clínica favorable, se le otorgó el alta toxicológica del episodio de intoxicación aguda a las 48 horas del ingreso, aunque continuó internada para ser evaluada por los Servicios de Salud Mental y Neumotisiología.

Tabla 1. Parámetros de laboratorio comparativo (ingreso-control)

| Parámetros | Laboratorio ingreso | Laboratorio control |
|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Ácido láctico (mmol/L) | 4,5 | 1,1 |
| pH | 7,27 | 7,38 |
| pCO ₂ (mmHg) | 38,5 | 40,2 |
| Bicarbonato (mEq/L) | 17,3 | 23,5 |
| Exceso de bases (mmol/L) | -8,4 | -1,2 |
| GOT (UI/L) | 19 | 16 |
| GPT (UI/L) | 8 | 12 |

Discusión

La INH inhibe la producción de ácido gamma-aminobutírico (GABA) (principal neurotransmisor inhibitor en sistema nervioso central) por depleción de vitamina B6 (piridoxina), vitamina requerida por la descarboxilasa del ácido glutámico para la producción del GABA. La INH actúa por dos mecanismos: los metabolitos hidracina de la INH inhiben la piridoxin fosfokinasa, (enzima que convierte a la piridoxina en

su forma activa piridoxal-5-fosfato) y, además, se liga con esta forma activa para producir isoniazida piridoxal hidrasona (esta molécula se excreta en orina y resulta en la disminución de los niveles de la vitamina). La disminución de la síntesis del GABA, se manifiesta con un cuadro convulsivo agudo.

La intoxicación por INH generalmente se presenta con un cuadro convulsivo que no cede con el tratamiento habitual. Comienza entre los

30 minutos y 3 horas luego de la ingesta, pudiendo ser recurrente, con acidosis metabólica y coma. Aunque las manifestaciones tempranas pueden ser los vómitos, enlentecimiento del habla, vértigo, y taquicardia, las convulsiones pueden representar el primer signo de toxicidad por INH (Hernon y Boyer 2011).

Entre los estudios complementarios a solicitar, se debe considerar al estado ácido base, ionograma, hepatograma, CPK y orina completa (Talamoni y Díaz 2012). La concentración de INH en sangre se correlaciona adecuadamente con el grado de intoxicación y el análisis no se encuentra disponible en laboratorios hospitalarios (Maw y Aitken 2003).

Todo paciente con intoxicación grave por INH debe permanecer en control clínico por un lapso de 6-36 horas por el riesgo de neurotoxicidad. Las convulsiones pueden aparecer con una ingesta mayor a 20 mg/kg, e invariablemente cuando es mayor de 35 a 40 mg/kg. Los pacientes con enfermedad epiléptica pueden presentar convulsiones con dosis menores. (Hernon y Boyer 2011). Es fundamental el tratamiento de sostén, como así también el tratamiento específico. En este caso, considerando el antecedente de ingesta de sobredosis intencional del fármaco, se indicaron medidas de rescate (lavado gástrico, carbón activado y leche de magnesia o sorbitol al 70 %), debido a varios factores: puede no ser confiable el relato en cuanto al tiempo transcurrido de la ingesta; pueden existir co-ingestas que no surgen en un primer momento de anamnesis; existen fármacos que pueden tener efecto de retraso de vaciamiento del contenido gástrico, considerando el potencial riesgo de presentar nuevas convulsiones. La piridoxina (vitamina B₆) es el antídoto específico y debe administrarse a todo paciente en quien se sospeche intoxicación con INH y que presente un cuadro neurológico agudo (tríada de convulsiones refractarias al tratamiento convencional, coma y acidosis metabólica) (Hernon y Boyer 2011). Incluso algunos autores proponen administrar piridoxina IV ante cualquier paciente con convulsiones refractarias al tratamiento estándar con benzodiazepinas, en regiones geográficas con riesgo para TBC (Nelson y Rella 1998)

Tras la administración de piridoxina la convulsión cede rápidamente, se corrige la acidosis metabólica y revierte el coma (Hernon y Boyer 2011). En el caso de esta paciente que se encontró lúcida, se administró piridoxina teniendo en cuenta que el estado de conciencia puede

retornar entre los episodios convulsivos (Geib y Shannon 2007). La dosis pediátrica es: 70 mg/kg en infusión IV durante 30-60 minutos hasta un máximo de 5 gramos (Hernon y Boyer 2011; Sweetman y Blake 2011; Talamoni y Díaz 2012). En pacientes adolescentes y adultos la relación es: 1 gramo de piridoxina por cada gramo de INH ingerida (1=1). No obstante las dosis mencionadas son orientativas, dado que existen propuestas terapéuticas de algunos autores que refieren que no se dispone de una dosis máxima, llegándose a utilizar altas dosis sin observar efectos adversos (Sweetman y Blake 2011). Cuando se desconoce la cantidad de INH ingerida, se indican 5 gramos de piridoxina. (Sweetman y Blake 2011; Klasco 2012). Las benzodiazepinas podrían utilizarse como anticonvulsivante potenciando a la piridoxina, siendo variable su efectividad cuando se administra como única droga (Hernon y Boyer 2011). Puede administrarse diazepam IV, de preferencia por una vía diferente a la piridoxina (Caksen y col. 2003).

La INH es dializable, pero usualmente la hemodiálisis no es necesaria si se administran dosis adecuadas de piridoxina y anticonvulsivantes (Maw y Aitken 2003).

Conclusiones

El resguardo de este tipo de medicación con acción neurotóxica, es fundamental para evitar intoxicaciones graves en pediatría. Ante un síndrome convulsivo agudo es necesario realizar una anamnesis completa y dirigida, recolectando datos que orienten a una posible causa tóxica para evitar el retraso del tratamiento adecuado. Debe considerarse la intoxicación por INH ante un paciente que presenta un cuadro convulsivo que no cede con el tratamiento habitual, acidosis metabólica resistente a la administración de bicarbonato de sodio y coma (Brunton y col. 2012). El cuadro clínico cederá definitivamente con la indicación del tratamiento específico, la accesibilidad inmediata y la indicación oportuna del antídoto, estableciéndose como las bases para una evolución satisfactoria.

Se deben incluir entre los diagnósticos diferenciales las causas tóxicas que provocan convulsiones, siendo las sustancias más frecuentemente involucradas: gases tóxicos (monóxido de carbono), medicamentos (lidocaína, isoniacida, anticonvulsivantes, teofilina, etc.), drogas de abuso (cocaína, anfetaminas), plaguicidas (organoclorados, organofosforados), plantas-

medicina folklórica (anis estrellado, aceites esenciales: alcanfor y mentol) y veneno de animales (casos de escorpionismo grave).

Sería recomendable que todos los hospitales de mediana complejidad contaran con una reserva del antidoto piridoxina, para no retrasar su administración (Morrow y col. 2006), lo cual incide directamente en la evolución satisfactoria del cuadro clínico.

Bibliografía citada

Brunton L., Chabner B., Knollman B. Quimioterapia de enfermedades microbianas. En: Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 12^a edición. New York, NY, USA. Mc Graw Hill Medical, 2012:1555-1558.

Çaksen H., Odabas D., Erol M., Anlar O., Tuncer O., Atas B. Do not overlook acute isoniazid poisoning in children with status epilepticus. *J Child Neurol.* 2003;18:142-143.

Geib A.J., Shannon M.W. Isoniazid. En: Shannon M., Borrow S., Burns M. Eds. Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and drug overdose. Philadelphia, PA, USA. Edit: Saunders Elsevier. 4th ed. 2007.

Hernon C., Boyer E. Antituberculous medications. En: Nelson L., Lewin N., Howland M., Hoffman R., Goldfrank L., Flomenbaum N. Goldfrank's Manual of Toxicologic Emergencies. New York, NY, USA. Mc Graw Hill Medical; 2011. P. 834-838.

Klasco R.K. (Ed): POISINDEX® System. Thomson Reuters, Greenwood Village, Colorado. Isoniazid 2012.

Maw G., Aitken P. Isoniazid overdose. A case series, literature review and survey of antidote availability. *Clin Drug Invest.* 2003;23(7):479-485.

Morrow L., Wear R., Schuller D., Malesker M. Acute Isoniazide toxicity and the need for adequate pyridoxine supplies. *Pharmacotherapy.* 2006;26(10):1529-1532.

Munoz Aguilar G., Alcon Saez J.J., Gomez Zafra R., Domingo Triado I. Intoxicación aguda por isoniácida: convulsión en paciente en tratamiento antituberculoso. *Anales Pediatricos (Barc).* 2013;80:58-59.

Nelson L., Rella J., Hoffman R. Status epilepticus. *New England Journal of Medicine.* 1998;339(6):409-10. Author reply 410.

Sweetman S., Blake P., Brayfield A., Mc Glasahan J., Neathercoat G., Parsons A. Antibacterials. Martindale: The Complete Drug Reference. Pharmaceutical Press. Thirty-seventh edition, 2011:313-316.

Talamoni M., Díaz M. Otros fármacos. Guía de diagnóstico y tratamiento en Toxicología. Eudeba, 2^o Edición. Buenos Aires; 2012:224-225.

Intoxicación por *Datura stramonium*: serie de tres casos *Datura stramonium* poisoning: series of three cases

Saracco, Aldo Sergio*; Lima, Cristian O.

Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico, Departamento de Toxicología, Ministerio Salud de Mendoza. Talcahuano S/N Godoy Cruz, Mendoza, Argentina. Tel: +54261 4282020. toxicologia@mendoza.gov.ar

*aldo.saracco@um.edu.ar

Recibido: 15 de junio de 2015

Aceptado: 7 de octubre de 2015

Resumen. Se presenta una serie de tres casos de pacientes menores de edad con intoxicación por ingesta de semillas de *Datura stramonium*, ocurridos durante el mes de mayo en la provincia de Mendoza. Pacientes de sexo masculino, ente 15 y 3 años de edad. Uno de ellos asociado con ingesta intencional de semillas y otros dos por intoxicación accidental al ingerir las semillas jugando con el fruto de la planta. La recolección de semillas se realizó en zona rural periurbana, y todos los casos fueron llevados a la consulta por familiares directos, ante la presencia de desorientación, ataxia y disartria. Los tres pacientes desarrollaron síndrome anticolinérgico, con delirio y alucinaciones, requiriendo internación y tratamiento sintomático, con buena evolución y recuperación completa entre las 24 y 72 horas. Se resalta el riesgo que representa la presencia de este vegetal tóxico, no sólo por su fácil disponibilidad, sino por las bajas dosis letales de sus alcaloides y la falta de diagnóstico etiológico por parte de los servicios de urgencia.

Palabras clave: Planta; Alucinógena; Intoxicación; Estramonio

Summary. A series of three cases of pediatric patients with poisoning by ingestion of seeds of *Datura stramonium*, which occurred during the month of May in the province of Mendoza is presented. Male patients, among 15 and 3 years old. One associated with intentional ingestion of seeds and other two by accidentally ingesting seeds while playing with the fruit of the poisonous plant. Seed collection was conducted in rural and peri-urban areas, and all patients were brought to the office by relatives, due to the presence of dysarthria disorientation and ataxia. The three patients developed anticholinergic syndrome with delirium and hallucinations, requiring hospitalization and symptomatic treatment. All cases had favorable outcome and complete recovery within 24 to 72 hours. It is highlighted the risk posed by the presence of this toxic plant, not only for its easy availability, but low lethal doses of its alkaloids and lack of etiological diagnosis by emergency services.

Keywords: Plant; Intoxication; Hallucinogenic; Jimson weed

Introducción

El estramonio (*Datura stramonium* L.) es una planta tóxica de la familia Solanaceae, utilizada por los seres humanos desde la antigüedad por sus propiedades alucinógenas y medicinales (Dewitt y col. 1997; Acebey y col. 2014). El género *Datura* L. comprende 14 especies (Hammer y col. 1983; Jiao y col. 2002), en su mayoría tóxicas, que se distribuyen principalmente en regiones tropicales y templadas de América Central y del Sur, aunque crecen en todas partes del globo a excepción de las regiones con climas polares y subpolares (El Bazaoui y col. 2011).

La *Datura stramonium*, también conocida como hierba de Jamestown, hierba hedionda, higuera loca, mata del infierno, manzana espinosa, berenjena del diablo, flor de la trompeta o trompetilla (Burillo-Putze y col. 2013). Es una

planta anual y cosmopolita, que posee grandes flores blancas con forma de trompeta, y frutos en cápsula de cuatro valvas recubiertas de espinas, que resultan especialmente llamativas (Figura 1). Dichas cápsulas contienen en su interior numerosas semillas de color pardo oscuro o negro, con forma arriñonada (Figura 2), consideradas como la parte más tóxica de la planta. Sus hojas de color verde oscuro, son ovales, agudas y recortadas, que le dan una forma puntiaguda (Figura 3). Los tallos y ramas, son lisos, lampiños, de color verde oscuro y desprenden un desagradable olor. Existen diversas variedades diferenciables, entre otras características, por el color de las flores y la densidad de espinas en las valvas de sus frutos (Soler Carracedo y col. 2013). Crece habitualmente en terrenos baldíos, zonas ricas en

residuos orgánicos, orillas de huertas y canales, donde suele adaptarse con cierta facilidad, llevando a que pueda hallarse próxima a zonas habitadas (Russell y col. 2010).



Figura 1. Aspecto de las cápsulas de semillas de la *Datura stramonium*.

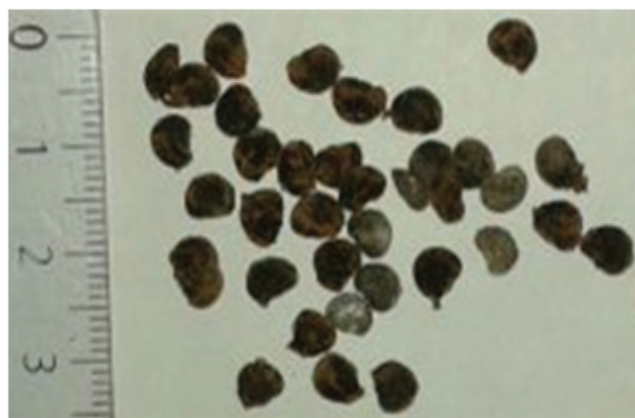


Figura 2. Aspecto de las semillas de la *Datura stramonium*.

Nota: escala en centímetros



Figura 3. Aspecto general del vegetal.

La toxicidad de la planta es debida a su contenido en alcaloides, de los cuales contiene alrededor de sesenta y siete, todos ellos tropánicos, destacándose tres: hiosciamina, atropina y escopolamina o hioscina (Roblot y col. 1995; Cartanon López y col. 2000), por ser los más activos y tóxicos, particularmente el primero; todos antagonistas muscarínicos competitivos de la acetilcolina y responsables de originar el cuadro anticolinérgico que presentan los intoxicados, con potencialidad letal (Alcaraz García y col. 1999; Thabet y col. 1999). El contenido total de alcaloides varía entre 0,25 % y 0,7 % del peso fresco de las hojas (Jiménez-Mejías y col. 1991), que consumidas en pequeñas cantidades actúan como estupefaciente, provocando delirio por alucinaciones durante horas (Tiongson y col. 1998). La toxicidad del estramonio es muy elevada, llevando a que ostente a nivel mundial el record de intoxicaciones por plantas venenosas. Su absorción es buena por vía mucosa y digestiva, con un amplio volumen de distribución, atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria, excretándose por orina y leche. El químico alemán Albert Ladenburg, es quien en 1980 logra aislar por primera vez la escopolamina a partir de *Datura stramonium*. Esta planta venenosa ha sido utilizada durante siglos por sus cualidades psicoactivas en rituales, ceremonias, medicina casera y elaboración de fármacos (Diker y col. 2007; Suk y col. 2010). Donde los principales síntomas de intoxicación son: sequedad de piel y mucosas (boca seca), rubicundez, cambios del humor, ataxia, midriasis, fotofobia, visión borrosa, mareos, taquicardia, hipertensión, íleo paralítico, retención urinaria, delirios con alucinaciones, excitación, agresividad, temblores, convulsiones y coma. Los síntomas se inician entre 1-4 horas tras la ingesta y pueden durar entre 24 a 48 horas (Vanderhoff y col. 1992; Spina y col. 2006), o más días, siendo habitual la amnesia total o parcial del episodio.

Excepcionalmente se han observado rabdomiolisis, arritmias malignas, signos neurológicos focales y coma, que puede acontecer sin necesariamente mostrarse el resto de la sintomatología descripta.

Las aplicaciones medicinales del estramonio son numerosas, pero la concentración de sustancias activas que contiene la planta varía mucho de una a otra, haciendo difícil establecer una dosis útil, situación que ha llevado a restringir su uso en la medicina natural. Las propiedades "mágicas" que se le han atribuido tra-

dicionalmente al estramonio han favorecido su utilización en los ámbitos más diversos (Glatstein y col. 2012). En la antigua Roma, devotas del dios Baco se extasiaban con plantas alucinógenas que algunos autores identifican como estramonio. Junto con la mandrágora o la belladona, el estramonio formaba parte de los brebajes asociados a la brujería durante la Edad Media, y los ungüentos que estas elaboraban para "volar". De ahí quizá que antes de ser pasadas por la hoguera, las acusadas de brujas, confesaban haber surcado los cielos, en lo que más bien había sido, más que probablemente, un viaje psicodélico (Scarlato y Weerner 2014). En Estados Unidos se la conoce como la hierba de Jamestown debido a que en 1676, en la localidad homónima (Virginia), un grupo de soldados sufrió una intoxicación masiva. Los alucinados tuvieron que ser encerrados para evitar una más que probable desgracia.

El tratamiento de la intoxicación es sintomático (Roblot y col. 1995), debiendo aplicarse ante la ingesta de semillas o partes de la planta, las medidas de descontaminación gastrointestinal, a través del lavado gástrico dentro de las primeras 4 horas post ingesta, seguido de la administración de carbón activado y de catártico, de no existir contraindicaciones por la excitación o el potencial riesgo de convulsiones (Rodgers y col. 1993; Net y Marruecos-Sant 2006). Debe asegurarse previamente la vía aérea, el suministro de oxígeno y una vía venosa periférica para el suministro de soluciones cristaloides, junto al sondaje vesical, necesario para el tratamiento de la retención urinaria. El paciente debe ser internado bajo estricta observación médica, en un ambiente tranquilo, con pocos estímulos lumínicos y sonoros, alejado de elementos que le permitan autolesionarse. Para controlar los cuadros excitación, delirio y conductas agresivas, la medida que más ayuda es la sedación con benzodiazepinas (lorazepam o midazolam) (Stella y col. 2010; Suk y col. 2010), desaconsejándose el uso de neurolepticos por sus efectos anticolinérgicos (Baselga y co. 1985; Kurzbaum y col. 2001). En los casos de manifestaciones graves, como convulsiones, hipertensión severa, arritmias o coma, y solo si son normales el intervalo PR y QRS, el tratamiento de elección es la administración de fisostigmina por vía endovenosa lenta, como antídoto específico que inhibe la enzima acetilcolinesterasa (Rodgers y col. 1993; Diker y col. 2007), que lleva a una mayor concentración de acetilcolina en el espacio sináptico neuronal,

que resultará en una unión de la misma a los receptores muscarínicos en lugar de los alcaloides, por un fenómeno de competición, con dosis de 1-2 mg diluidos en 10 ml de suero fisiológico, a pasar en 5-10 min en adultos y 0,02 mg en niños. La respuesta al tratamiento es rápida y la duración de su efecto es corta, por lo que se puede repetir una segunda dosis superado ese período de tiempo, si no se observa respuesta por parte del paciente, nunca superando los 4 mg/h en adultos o 1 mg/h en niños, si las manifestaciones clínicas así lo requieren (Glatstein y col. 2012).

La administración de fisostigmina está contraindicada si el paciente presenta asma bronquial, enfermedad coronaria u obstrucción mecánica del tracto gastrointestinal y/o urinario (Diker y col. 2007). Recomendándose la asistencia psiquiátrica si el consumo fue intencional (Montcriol y col. 2007).

Casos clínicos

Se presentan tres casos de intoxicación asistidos por el Centro de Intoxicaciones de Mendoza por ingesta de semillas de *Datura stramonium*, provenientes de áreas rurales ubicadas el sur y centro de la provincia. La consulta consistió tanto en el asesoramiento diagnóstico, como en la asistencia posterior. El primer caso, varón de 15 años de edad, llevado por familiares desde su domicilio en horas de la madrugada, a Servicio de Urgencias de hospital público, por presentar sintomatología consistente en ataxia, boca seca, visión borrosa, taquicardia y nerviosismo, sumándose a las dos horas, midriasis hiporreactiva, delirio y alucinaciones. El diagnóstico de ingreso es síndrome anticolinérgico, quedando internado bajo tratamiento sintomático, y requerimiento de lorazepam por vía parenteral, ante cuadro de excitación y conducta agresiva. Por interrogatorio dirigido a familiares, surge antecedente de abuso de sustancia psicoactivas, hallándose en sus bolsillos semillas negras pequeñas (Figura 2). Horas después del ingreso, un tercero aporta la planta (Figura 3), refiriendo que es de donde se extrajeron las semillas consumidas por el adolescente, la que se identifica como ejemplar de *Datura stramonium*, lo que sumado al cuadro clínico anticolinérgico, confirma diagnóstico etiológico. El paciente queda asintomático en las primeras 36 horas del ingreso, sin aparición de ninguna complicación, no precisando del uso de fármacos anticolinesterásicos, procediéndose a darle el alta a las 72 horas del ingreso.

En un Centro Asistencial del sur provincial, son llevados por su padre en horas de la tarde, dos hermanos de 3 y 7 años, refiriendo que los niños estaban jugando solos en el patio de su vivienda rural, donde los encuentra atáxicos y disártricos. En el Servicio de Urgencia se constata rubicundez, midriasis, taquicardia, agitación, desorientación y alucinaciones, durante su examen. El familiar niega presencia de psicofármacos en el hogar, ingesta de medicamentos o exposición a otros tóxicos, como plaguicidas o drogas de abuso, entre otros interrogados. Se indica medidas de descontaminación gastrointestinal e internación con medidas de soporte y tratamiento sintomático. Ante el cuadro y evolución clínica se diagnóstica síndrome anticolinérgico. Ante las explica-

ciones del padre, el lugar donde estaban los niños y el cuadro clínico presentado, se sospecha intoxicación por plantas, por lo que se muestran fotos de ejemplares al progenitor, el que al visualizar una de *Datura stramonium*, la identifica en el lugar donde habían estado jugando los niños, confirmándose el diagnóstico etiológico. Los niños quedan asintomáticos en las primeras 12-24 horas del ingreso, donde reconoce el mayor haber ingerido las semillas jugando, siendo además observadas en las deposiciones de la mañana por parte del personal de enfermería. Ambos pacientes evolucionan sin ninguna complicación, procediéndose al alta a las 48 horas del ingreso. En la *Tabla 1* se presentan esquemáticamente los casos de intoxicación.

Tabla 1. Casos clínicos por ingesta semillas de *Datura stramonium*, asistidos por el Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico de Mendoza.

| Caso | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Sexo | Masculino | Masculino | Masculino |
| Edad (años) | 15 | 7 | 3 |
| Demora en la consulta | 5 horas | 2 horas | 2 horas |
| Antecedentes | Abuso de drogas | Jugaba en patio vivienda rural | Jugaba en patio vivienda rural |
| Clínica al ingreso | Midriasis bilateral hiporeactiva | Midriasis bilateral hiporeactiva | Midriasis bilateral hiporeactiva |
| | Disartria | Taquicardia | Taquicardia |
| | Taquicardia | Rubicundez | Rubicundez |
| | Hipertensión Nerviosismo | Desorientación | Desorientación |
| Evolución | Rubicundez y mucosas | Sequedad de piel y mucosas | Sequedad de piel y mucosas |
| | Excitación | Nerviosismo | Alucinaciones |
| | Delirio | Alucinaciones | Tendencia al sueño |
| | Alucinaciones | Internación en UTIP | Constipación Internación en UTIP |
| Tratamiento | Medidas de soporte vital | Medidas de soporte vital | Medidas de soporte vital |
| | Lorazepam IM | Carbón activado | Carbón activado |
| | Purgante | Purgante | Purgante |

Conclusión

El objetivo de esta comunicación es dar a conocer una serie de casos de intoxicación por estramonio con evolución favorable, así como asesorar e informar sobre la toxicidad y manejo adecuado del paciente intoxicado, dado que existen muy pocos casos documentados de su exposición, probablemente debido a la falta de un interrogatorio dirigido hacia el consumo de la planta. Los médicos de urgencia deberían incluir esta eventualidad en el diagnóstico diferencial de síndromes anticolinérgicos. La intoxicación por *Datura stramonium* representa un riesgo no sólo por las bajas dosis letales de sus alcaloides, sino también por su fácil disponibilidad. Es más frecuente en personas que la consumen como droga alucinógena y menos frecuente como intoxicación accidental en niños, en donde los cuadros de envenenamiento pueden ser diagnosticados erróneamente como de etiología desconocida. En general el diagnóstico es clínico y el tratamiento sintomático, consistente en descontaminación gastrointestinal, medidas de soporte y resguardo del paciente a estímulos sensoriales, requiriendo en ocasiones contención física y farmacológica. Se debe realizar diagnóstico diferencial con otras intoxicaciones que producen síndromes anticolinérgicos, como las ocasionadas por fármacos (atropina, antidepresivos tricíclicos, antihistamínicos) y otras plantas (*Datura ferox* L. "chamico"; *Brugmansia arborea* "floripondio"; *Atropa belladonna* "belladona"; *Mandragora autumnalis* "mandrágora"). Además de descartar otras causas de agitación, delirio y alucinaciones. En los tres casos asistidos, se llegó al diagnóstico tras una detallada historia clínica y tras la identificación de la planta por parte de un miembro de la familia, al mostrársele una imagen obtenida por internet, siendo este medio, en el caso de intoxicaciones por plantas, una herramienta de gran importancia, dada la diferente toxicidad de cada caso.

Bibliografía citada

- Acebey L. Román R., Espinosa J., León Y. Vázquez G. Intoxicaciones agudas por plantas tóxicas reportadas por Centro de Toxicología de Villa Clara en período 2008-2011. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2014;19(4).
- Alcaraz García S., Girón Úbeda J., Delgado López F., Gómez García A. Midriasis por contacto accidental con estramonio (*Datura stramonium*). Med Clin (Barc). 1999;113:156.
- Baselga J., Pigron C., Martínez-Vázquez J. *Datura stramonium*: ¿un antiguo alucinógeno en auge? Med Clin (Barc). 1985;84:715.
- Burillo-Putze G., López Briz E., Climent Díaz B., Munné Mas P., Nogue Xarau S., Pinillos M., Hoffman R. Drogas emergentes (III): plantas y hongos alucinógenos. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2013;36(3):505-518.
- Cartanon López L., Martínez Badás J., Lapena López de Armentia S., Gómez Mora J., García Arias M. Intoxicación por *Datura stramonium*. An Esp Pediatr. 2000;53(1):53-55.
- Dewitt M., Swain R., Gibson L. Jr. The dangers of jimson weed and its abuse by teenagers in the Kanawha Valley of West Virginia. W V Med J. 1997;93:182-185.
- Diker D., Markovitz D., Rothman M., Sendovski U. Coma as a presenting sign of *Datura stramonium* seed tea poisoning. European Journal of Internal Medicine. 2007;18:336-338.
- El Bazaoui A., Bellimam M., Soulaymani A. Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. Fitoterapia. 2011;82:193-197.
- Fandiño-Orgeira J., Fernández-Ameneiros M., Oubiña-González W. Alucinaciones y agitación en dos pacientes jóvenes. Med Clin (Barc). 2005;125:556-557.
- Glatstein M., Alabdulrazzaq F., Garcia-Bournissen F., Scolnik D. Use of physostigmine for hallucinogenic plant poisoning in a teenager: case report and review of the literature. American Journal of Therapeutics. 2012;19:384-388.
- Jakabová S., Vincze L., Farkas Á., Kilár F., Boros B., Felinger A. Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. Journal of Chromatography A. 2012;1232:295-301.
- Jiao M., Luna-Cavazos M., Bye R. Allozyme variation in Mexican species and classification of *Datura* (Solanaceae). Plant Systematics and Evolution, 2002;232(3-4):155-166.

Jiménez-Mejías M., Fernández A., Montañó-Díaz M., González de la Puente M.. Síndrome anticolinérgico por envenenamiento por *Datura stramonium*. Med Clin (Barc). 1991;97:237.

Kurzbaum A., Simsolo C., Kuasha L., Blum A. Toxic delirium due to *Datura stramonium*. Israel Medical Association Journal. 2001; 3: 538-539.

Montcriol A., Kenane N., Delort G., Asencio Y., Palmier B. Intentional *Datura stramonium* intoxication: an unknown etiology of midriasis. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. 2007;26:810-813.

Net A., Marruecos-Sant L. Intoxicaciones agudas graves. Barcelona: Ars Medica; 2006.

Roblot F., Montaz L., Delcoustal M., Gaboriau E., Chavagnat J.J., Morichaud G., Pourrat O., Scipi M., Patte D. *Datura stramonium* poisoning: the diagnosis is clinical, treatment is symptomatic. Rev Med Intern (Paris). 1995;16:187-190.

Rodgers G., Von Kanel R. Conservative treatment of Jimson weed ingestion. Vet Hum Toxicol. 1993;35:32-33.

Russell J., Edwards C., Jordan C., Luckman E., Chu A., Blythe D., Krick J. Jimsonweed poisoning associated with a homemade stew, Maryland, 2008. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2010;59(4):102-4.

Scarlato E., Weerner A. Venenos en el arte, Luces, sombras y matices de la toxicología, Olmo Ed, 2014.

Soler Carracedo A., Rubio Armendáriz C., Hardisson de La Torre A., Gutiérrez Fernández A.J. *Datura stramonium*: toxicología de una droga emergente. Farmacéuticos Comunitarios. 2013;5(2):74-78.

Spina S.P., Taddei A. Teenagers with Jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. Canadian Journal of Emergency Medicine. 2007;9(6):467-469.

Stella L., Vitelli M.R., Palazzo E., Oliva P., De Novellis V., Capuano A., Scafuro M.A., Berrino L., Rossi F., Maione S. *Datura stramonium* intake: a report on three cases. Journal of Psychoactive Drugs. 2010;42(4):507-512.

Suk S.H., Kwak Y.T. Toxic encephalopathy after taking dried seeds of *Datura stramonium* in two elderly subjects. Geriatrics & Gerontology International. 2010;9:326-328.

Thabet H., Brahmi N., Amamou M., Ben Salah N., Hedhili A., Yacoud M. *Datura stramonium* poisonings in humans. Vet Hum Toxicol. 1999;41(5):320-321.

Tiongson J., Salen P. Mass ingestion of Jimson Weed by eleven teenagers. Del Med J. 1998;70:971-976.

Vanderhoff B.T., Mosser K.H. Jimson weed toxicity: management of anticholinergic plant ingestion. Am Fam Physician. 1992;46:526-530.

COMUNICACIONES BREVES

Fermentação em estado sólido de *Aspergillus parasiticus* e produção de aflatoxinas Solid state fermentation of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production

Domingues, Jéssica Mari*; Carneiro Gomes, Eliane; Brand, Debora; Wagner, Ricardo

Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR. Av. Prof. Lothário Meissner, Av. Prof. Lothário Meissner, 632; 80.210-170, Curitiba, PR, Brasil

*jm-domingues@hotmail.com

Recibido: 15 de diciembre de 2014

Aceptado: 30 de julio de 2015

Resumo. Aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos com grande potencial carcinogênico, produzidos principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Em vista da ampla variedade de alimentos em que se encontram essas micotoxinas, o presente estudo teve como objetivo determinar condições de cultivo para o *Aspergillus parasiticus* e produção das quatro principais aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) considerando diferentes substratos conhecidos pela contaminação por estas micotoxinas, entre eles arroz branco, arroz cateto, amendoim, milho e farinha de trigo integral, e diferentes valores de umidade e pH. Ao analisar por cromatografia em camada delgada os extratos dos diferentes substratos, verificou-se a produção de aflatoxinas em todos os alimentos, porém na cromatografia líquida de alta eficiência foi possível perceber a maior produção de aflatoxinas no arroz cateto e na farinha de trigo integral. Para a continuidade do trabalho, utilizou-se o arroz cateto e então preparou-se diferentes meios sólidos com valores de pH entre 3,5 e 7,5 e umidade entre 42 % e 62 %. Ao analisar por CLAE, todas as amostras apresentaram produção de AF, porém as amostras com o maior valor de água agregada (62%) apresentaram maior produção enquanto a variação de pH não apresentou influência nesta produção.

Palavras-chave: *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxinas, Fermentação estado sólido, Alimentos.

Abstract. Aflatoxins are secondary metabolites of fungi with great carcinogenic potencial, mainly produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In order of the wide variety of foods where mycotoxins are found in, this study aimed to determine growth conditions for *Aspergillus parasiticus* and production of four major aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) considering different substrates known for contamination by these aflatoxins, including white rice, cathetus rice, peanuts, maize and whole wheat flour, and different pH and humidity values. When extracts of different substrates were analyzed by thin layer chromatography, it has been verified the production of aflatoxins in all foods; however, when high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed, the greater production of aflatoxins was observed in cathetus rice and whole-wheat flour. Cathetus rice was then selected to continue the study and different solid medium with pH values between 3.5 and 7.5 and humidity percentages between 42 % and 62 % were prepared. When analyzed by HPLC, all samples showed production of aflatoxins, but the samples with higher humidity value (62%) showed greatest production while the pH changes had no effect on this production.

Keywords: *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxins, Solid state fermentation, Food.

Introdução

Aflatoxinas (AF) são metabólitos secundários produzidos por fungos e que interferem no funcionamento do sistema imunológico, além de apresentarem o maior potencial carcinogênico natural conhecido em animais e humanos (Kumar *et al.* 2008). Durante muito tempo acreditou-se que apenas *Aspergillus* seção *flavi* eram produtores de AF, porém atualmente, mesmo sabendo que estes são os maiores produtores, outros gêneros também foram descritos

como produtores desta micotoxina (Frisvad *et al.* 2005).

Dentro da seção *Flavi*, os maiores produtores de AF são as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*. São relatadas aproximadamente 20 formas de aflatoxinas, entretanto o *A. parasiticus* é especialmente conhecido por apresentar a maior quantidade de cepas capazes de produzir altas concentrações das principais formas que são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, sendo que a AFB1

é geralmente encontrada em grande quantidade como contaminante em alimentos (Sama-pundo *et al.* 2007; Lozano-Ojalvo *et al.* 2013). O gênero *Aspergillus* produz outras micotoxinas além das AF, como o *A. flavus*, que produz o ácido ciclopiazônico, uma potente neurotoxina (Reis *et al.* 2014).

Para a identificação desta seção de fungos, comumente são realizadas análises bioquímicas e morfológicas. Para a diferenciação entre *A. flavus* e *A. parasiticus*, primeiramente são analisados os conídios, para os quais *A. flavus* apresenta paredes finas, de leve a moderadamente rugosas e com uma forma esférica a elíptica. Os conídios de *A. parasiticus* são mais esféricos e crescem em projeção de espinhos. Quando cultivados em Czapek-Dox o *A. flavus* apresenta cor amarelo esverdeado enquanto o *A. parasiticus* apresenta cor verde escuro (Rodrigues *et al.* 2009).

Para as aflatoxinas existem dois principais fatores que juntos favorecem a produção da mesma, a temperatura e umidade. O gênero *Aspergillus* possui a capacidade de crescer em várias condições climáticas, favorecendo a produção de micotoxinas, porém grãos armazenados em temperaturas quentes e com alta umidade apresentam maior potencial de contaminação (Richard 2007).

Entre os alimentos passíveis de crescimento de fungos produtores de AF, estão milho, arroz e outros. A produção de micotoxinas pode não afetar o rendimento da colheita, como no amendoim, porém a ingestão destes alimentos contaminados apresenta riscos à saúde de várias espécies animais, além dos humanos, embora estes efeitos variem de acordo com idade, sexo e condições nutricionais (Binder 2007; Kumar *et al.* 2008).

Os estudo de crescimento fúngico em ágar já é realizado há muito tempo e novos estudos tem utilizado a fermentação em estado sólido e com múltiplas finalidades, como a produção de metabólitos. Este processo envolve uma matriz sólida com ausência ou baixas quantidades de água livre, exigindo apenas uma quantidade de água suficiente para o crescimento e metabolismo do microorganismo a ser cultivado e, devido a isso, fungos e leveduras são os microorganismos mais adequados para este processo (Pandey 2003; Singhania *et al.* 2009).

Existem vários aspectos importantes no processo de fermentação em estado sólido, entre eles está a seleção do substrato, o qual deve oferecer suporte físico e nutrientes para

o microorganismo. Quando o objetivo desta fermentação é a obtenção de um produto específico deve-se testar diferentes substratos para definir o mais adequado. Umidade, pH e temperatura de incubação também são parâmetros importantes que devem ser analisados para a fermentação em estado sólido (Bellon-Maurel *et al.* 2003; Pandey 2003).

Sabendo-se da ampla variedade de condições existentes para a produção de aflatoxinas, o presente trabalho teve como objetivo verificar o substrato adequado para a produção de AF em meio sólido por *A. parasiticus* e analisar a influência do pH e umidade sobre esta produção.

Métodos

A cepa utilizada foi *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, obtida através do site www.nrrl.ncaer.usda.gov. Para o crescimento da cepa, transferiu-se o fungo liofilizado para um frasco erlenmeyer contendo 5 mL de caldo batata dextrose com pH 4,91 e incubou-se a 24 °C em um agitador orbital a 150 rpm durante 1 dia. Para a ativação do fungo, realizou-se repique da cepa original para tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose que foram incubados a 28 °C durante 4 dias em estufa. Adicionou-se 1 mL de caldo batata dextrose no tubo de ensaio com o cultivo, raspou-se os esporos e transferiu-se 800 µL do caldo com os esporos para um frasco erlenmeyer contendo 9 mL de caldo que foi incubado a 28 °C em um agitador orbital a 150 rpm durante 24 horas. Após o período de incubação, transferiu-se 3 mL do caldo para um erlenmeyer com 30 mL de ágar batata dextrose e incubou-se na estufa a 28 °C durante 7 dias. Adicionou-se ao frasco 20 mL de solução tween 80 a 0,5 % (v/v), 10 pérolas de vidro e uma barra magnética e deixou-se o frasco durante 10 minutos sob agitação magnética para a recuperação dos esporos, obtendo-se assim a suspensão de esporos utilizada como inóculo.

A análise morfológica foi realizada por cultivo entre lâmina e lamínula com 200 µL de ágar batata dextrose e 20 µL de inóculo, após o período de incubação de 3 dias a 28 °C na estufa, visualizou-se o cultivo em microscópio óptico. Para se avaliar o substrato de crescimento fúngico utilizou-se os seguintes alimentos: amendoim, milho, arroz branco, arroz cateto e farinha de trigo integral com umidades específicas para cada substrato (tabela 1) e então transferiu-se 1 mL do inóculo para cada substrato. Incubou-se a 28 °C por 5 dias e posteriormente

Tabela 1. Meios sólidos testados para a produção de aflatoxinas com seus respectivos teores de água agregada.

| Substrato | Alimento (g) | Água (mL) | Água agregada (%) |
|---------------------------|--------------|-----------|-------------------|
| Arroz cateto | 10 | 11 | 52,4 |
| Arroz branco | 10 | 10 | 50,0 |
| Amendoim | 5 | 8 | 61,5 |
| Farinha de trigo integral | 5 | 10 | 66,7 |
| Milho | 10 | 10 | 50,0 |

Tabela 2. Substrato escolhido (arroz cateto) com diferentes valores de pH e água agregada

| Amostra | pH | Água agregada (%) |
|---------|-----|-------------------|
| 1 | 3,5 | 42 |
| 2 | 3,5 | 52 |
| 3 | 3,5 | 62 |
| 4 | 5,5 | 42 |
| 5 | 5,5 | 52 |
| 6 | 5,5 | 62 |
| 7 | 7,5 | 42 |
| 8 | 7,5 | 52 |
| 9 | 7,5 | 62 |

analisou-se a produção de AF por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Depois de estabelecido o melhor substrato para a fermentação em estado sólido, preparou-se meios com o substrato escolhido em diferentes valores de pH entre 3,5 e 7,5 ajustados com ácido sulfúrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,5 M e diferentes umidades (água agregada) entre 42 % e 62 % conforme a *tabela 2*. Os meios foram incubados a 28 °C durante 5 dias. Após o período de incubação, verificou-se o pH das culturas e posteriormente a produção de AF foi analisada por CCD e CLAE.

Para a extração das aflatoxinas adicionou-se 10 mL de clorofórmio no cultivo e agitou-se por 5 minutos. Filtrou-se o clorofórmio em pa-

pel filtro e então repetiu-se o procedimento, o clorofórmio foi evaporado. Para a limpeza solubilizou-se o resíduo com 10 mL de metanol ao qual adicionou-se 5 mL de hexano e 5 mL cloreto de sódio 4 %, agitou-se e o hexano foi descartado. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio e água, agitou-se e então filtrou-se a camada clorofórmica. Evaporou-se o clorofórmio, adicionou-se 1 mL de acetonitrila nas amostras para analisá-las por CLAE.

Para a análise dos substratos em cromatografia em camada delgada utilizou-se como fase estacionária placas de sílica gel G com indicador de fluorescência (Merck) e como fase móvel clorofórmio:acetona 9:1 (v/v) com corrida de 10 cm.

A CLAE foi realizada em equipamento Varian

Prostar, coluna Microsorb-MV C18 (4,6 mm x 250 mm x 5 μ m). Os solventes utilizados foram Merck, e como fase móvel utilizou-se água:metanol:acetonitrila (5:4:1). O fluxo foi 0,8 mL/min e o volume de injeção foi 10 μ L. A temperatura durante as análises foi 21 °C e o detector foi o fluorescência com λ_{ex} =365 nm e λ_{em} = 455 nm.

Resultados e discussão

A análise morfológica do crescimento fúngico entre lâmina e lamínula da cepa de *Aspergillus parasiticus* apresentou conídios verde escuro, esféricos e em projeção em forma de espinhos, diferentemente da descrição de literatura da cepa de *Aspergillus flavus* que possui conídios com paredes finas, moderadamente rugosas e com forma esférica a elíptica. Sa-

bendo que a cepa utilizada é *Aspergillus parasiticus* se confirmam as estruturas reprodutivas da mesma (figura 1).

Para a escolha do substrato adequado para a produção de aflatoxinas optou-se pela análise destas micotoxinas em CCD, onde foi possível perceber que ocorre uma melhor produção das 4 principais AF em arroz cateto, arroz branco e farinha de trigo integral, porém houve produção em todos os substratos. Ao analisar por CLAE verificou-se novamente a produção de AF em todos os substratos, porém o arroz cateto e a farinha de trigo integral apresentaram uma boa produção com menos substâncias provenientes da matriz. Para a continuidade do trabalho, optou-se pelo arroz cateto como meio de produção por apresentar maior facilidade de trabalho que a farinha.

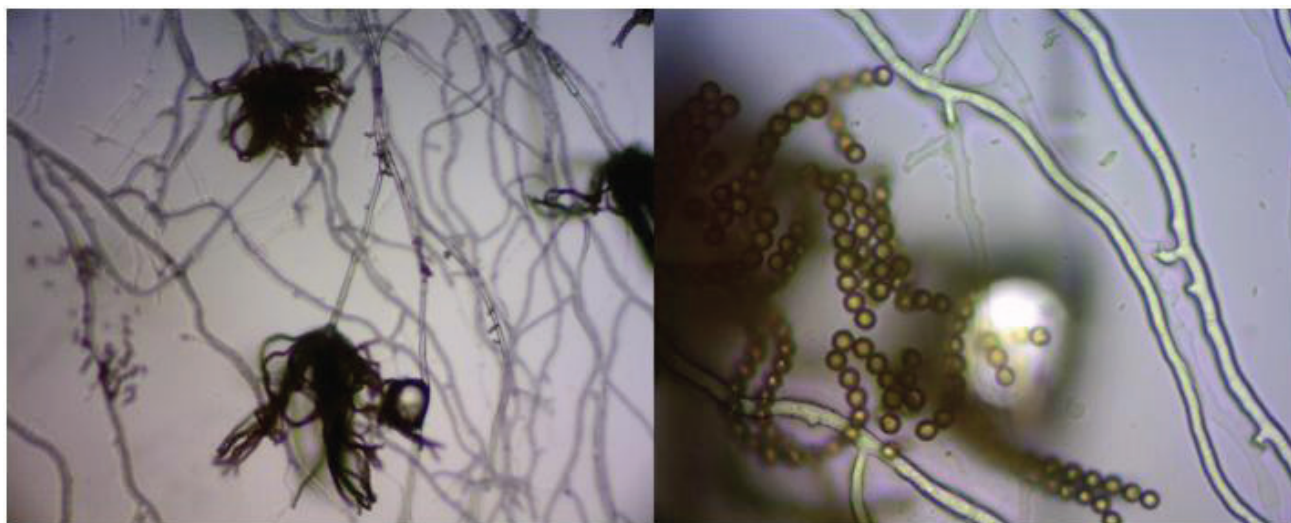


Figura 1. Crescimento de *Aspergillus parasiticus* entre lâmina e lamínula. Em (A) aumento de 40x e em (B) aumento de 100x.

Tabela 3. Valores de pH das culturas após período de incubação a 28 °C durante 5 dias.

| Amostra | pH | Amostra | pH | Amostra | pH |
|---------|------|---------|------|---------|------|
| 1 | 5,46 | 4 | 5,54 | 7 | 5,41 |
| 2 | 5,23 | 5 | 5,34 | 8 | 5,45 |
| 3 | 4,88 | 6 | 5,4 | 9 | 5,31 |

Para a avaliação da influência qualitativa do pH e umidade para o crescimento e produção de aflatoxinas escolheu-se acompanhar a produção por CCD, onde verificou-se que ocorre produção de aflatoxinas em todas as amostras, independente do pH e da água agregada ao meio, portanto estes fatores não apresentaram influência qualitativa sobre a produção de AF. Ao verificar o pH dos cultivos após o período de incubação percebeu-se que todos os cultivos apresentaram pH próximo a 5 conforme a *tabela 3*.

Para analisar a influência quantitativa do pH e água agregada sobre a produção de AF, analisou-se as amostras em CLAE, onde foi possível

perceber que as amostras 3, 6 e 9 que apresentavam a maior umidade (62 %) apresentaram maior produção de AF que as outras amostras conforme a *figura 2*.

Conforme Mateles e Adye (1965) constataram, o valor de pH parece não apresentar grande influência sobre a produção de aflatoxinas, pois após a produção das mesmas, todos os cultivos alcançaram valores próximos de pH. Ao analisar por CLAE, a produção de AF dentro da mesma faixa de pH apresentou uma grande variação de acordo com a umidade, mas a mesma faixa de umidade não apresentou uma grande variação conforme a alteração de pH.

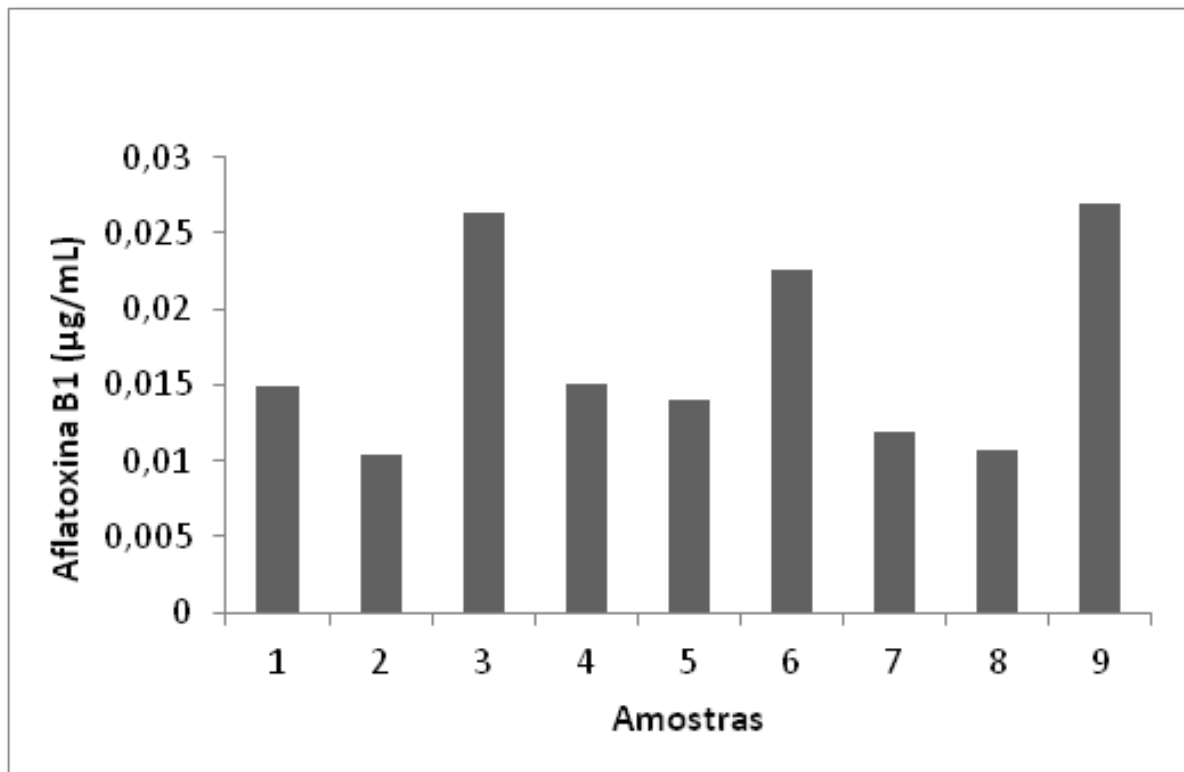


Figura 2. Influência pH e umidade na produção de AF.

Conclusão

Os substratos testados neste trabalho para o crescimento fúngico são alimentos citados na literatura como produtos passíveis de contaminação por aflatoxinas. Ao analisar os diferentes substratos para a fermentação em estado sólido, observou-se a produção de aflatoxinas em todos os alimentos testados, porém houve uma maior produção com menos interferentes provenientes da matriz sólida no arroz cateto e

na farinha de trigo integral. O crescimento de *A. parasiticus* ocorreu em todas as diferentes condições de pH e umidade testadas e mesmo não sendo condições adequadas produziu-se aflatoxinas. Sabe-se que na fermentação em estado sólido, a água livre no processo é ausente ou em volumes baixos, mas é necessária uma umidade suficiente para sustentar o crescimento e metabolismo do microrganismo. Quando em condições de umidade mais elevadas

a produção de AF foi maior, porém a variação de pH não interferiu de forma quantitativa nessa produção. Desta maneira o método de fermentação em estado sólido mostrou-se eficaz para o crescimento fúngico e produção de AF. Através deste método o isolamento das AF é mais simples, pois não se tem os interferentes do cultivo submerso em meio líquido.

Referências

- Bellon-Maurel V., Orliac O., Christen P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*. 2003;38(6):881-896.
- Binder E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*. 2007;133(1-2):149-166.
- Frisvad J.C., Skouboe P., Samson R.A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin. *Microbiology*. 2005;28(5):442-453.
- Kumar V., Basu M.S., Rajendran T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*. 2008;27(6):891-905.
- Lozano-Ojalvo D., Rodríguez A., Bernáldez V., Córdoba J.J., Rodríguez M. Influence of temperature and substrate conditions on the omt-1 gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;166(2):263-269.
- Mateles R.I., Auye J.C. Production of Aflatoxins in Submerged Culture. *Applied Microbiology*. 1965;13(2):208-211.
- Pandey A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;13(2-3):81-84.
- Reis T.A., Baquião A.C., Atayde D.D., Grabarz F., Corrêa B. Characterization of *Aspergillus* Section Flavi isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. *Food Microbiology*. 2014;42:34-39.
- Richard J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;119(1-2):3-10.
- Rodrigues P., Venâncio A., Kozakiewicz Z., Lima N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129(2):187-193.
- Samapundo S., Devlieghere F., Geeraerd A.H., De Meulenaer B., Van Impe J.F., Debevere J. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. *Food Microbiology*. 2007;24(5):517-529.
- Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2009;44(1):13-18.

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

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

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

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

Unidades de medida. Las medidas de longi-

tud, 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 subscript asterisk next to the name).

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

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

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

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

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

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

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

make sure that each table is cited in the text.

Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals and presented in separate pages. Drawings must be of good enough quality to ensure adequate reproduction. Bar, pie or statistical charts must be prepared in GIF format. Numbers, letters and signs within figures must be of the appropriate size to be legible when the final sizing takes place. All signs used must have a reference in the figure caption.

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements. Limit to a single para-

graph, 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 corresponder.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemplos:

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

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

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

Exemplos:

1. Artigo padrão em publicação periódica

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-287.

2. Livros e monografias

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

3. Capítulo de livro

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

4. Material eletrônico

a. Artigo em publicação periódica em internet

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

b. Página de internet

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

c. Parte de uma página de internet

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

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