

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 24
N° 3
Diciembre 2016

Acta Toxicológica Argentina es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, resúmenes de tesis, imágenes, cartas al editor y noticias.

Acta Toxicológica Argentina integra el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través del Portal de Revistas Científicas y Técnicas argentinas (PPCT) y a través de la *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) Argentina.

Se encuentra indexada en los siguientes directorios:

Biblioteca Virtual en Salud
Chemical Abstract Service
Directory of Open Access Journals
Directory of Open Access Resources
Latindex



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

*Acta
Toxicológica
Argentina*

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión directiva

Presidente

Susana Isabel García

Vicepresidente

Mirtha Nassetta

Tesorero

Augusto Piazza

Secretaria

Edda Cristina Villaamil Lepori

Vocales

Adriana Inés Haas

Adolfo Rafael de Roodt

Gabriela Fiorenza Biancucci

Vocales suplentes

Aldo Sergio Saracco

Adriana Ángela Pérez

Diana Mary González

Comité científico

Nélida Cristina Rubio

Silvia Cristina Cortese

María Graciela Bovi Mitre

Ricardo Antonio Fernández

Adriana Silvia Ridolfi

Órgano de fiscalización

Mirta E. Ryczel

Jorge Rubén Zavatti

Daniel Armando Méndez

Tribunal de honor

José A. Castro

María Rosa Llorens

Jorge Scagnetti

Acta Toxicológica Argentina

Director

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

Comité de redacción

Ricardo A. Fernández, *Htal. Infantil Municipal, Fac. Medicina, UCCor*

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

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

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

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

Comité de apoyo

Gabriela Fiorenza Biancucci, *Fac. Medicina, UNL*

Mirtha Nassetta, *ISEA, Univ. Nac. de Córdoba*

Vanessa Oliveira, *ProNCEZ, MSAL de la Nación*

Patricia N. Quiroga, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

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

Comité editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

Arturo Anadón Navarro, *Universidad Complutense de Madrid, España*

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

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

Heraldo N. Donnerwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

Gina E. D'Suze García, *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*

Miguel Ángel Sogorb Sánchez, *Universidad Miguel Hernández, España*

Norma Vallejo, *SEDRONAR, Argentina*

Eugenio Vilanova Gisbert, *Universidad Miguel Hernández, España*

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

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

INDICE (CONTENTS)

Artículos originales

- Avaliação da atividade anti-Leishmania e anti-Trypanosoma do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L.
Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo, Francisco Rodolpho; de Araújo Delmondes, Gyllyandeson; Paulo da Cruz, Luzia; Amaro do Nascimento, Érika; Relison Tintino Saulo; Santiago Lemos, Izabel Cristina; Bezerra da Cunha, Francisco Assis; Vega Gomez, Maria Celeste; Coronel, Cathia; Martins da Costa, José Galberto; Melo Coutinho, Henrique Douglas; Bezerra Felipe, Cicero Francisco; Alencar de Menezes, Irwin Rose; Kerntopf, Marta Regina 173
- Determinación de etilentiourea en acelgas tratadas con Zineb. Efecto del calor húmedo por ebullición
Ríos, Francisco Teodoro; Wierna, Norma Rosario; Ruggeri, María Alejandra; Bovi Mitre María Graciela 180
- Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolana* y *Psidium myrsinites* DC. A. contra peroxidación lipídica inducida por hierro II
Leite, Nadghia F.; Sobral-Souza, Celestina E., Matias, Edinaldo F.F.; Alencar, Liscássia B.B.; Albuquerque, Rosimeire S.; Morais-Braga, Maria F.B.; Souza, Erlanio O.; Coutinho, Henrique D.M...... 187
- Avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos (Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas
Santos de Souza, Mateus; Zimmermann Prado Rodrigues, Gabriela; Dalzochio Thaís, Goldoni Angélica; Ressel Simões, Leonardo Airton; Gehlen Günther, Basso da Silva Luciano 193
- Resúmenes de tesis
- Estudio de factores que regulan la biotransformación del arsénico en poblaciones expuestas crónicamente
Olmos, Valentina 200
- Instrucciones para los autores 202

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

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

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

ARTÍCULOS ORIGINALES

Avaliação da atividade anti-Leishmania e anti-Trypanosoma do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L.

Evaluation of the anti-leishmania and anti-trypanosoma activity of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L.

Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo, Francisco Rodolpho¹; de Araújo Delmondes, Gyllyandeson¹; Paulo da Cruz, Luíza¹; Amaro do Nascimento, Érika¹; Relison Tintino Saulo²; Santiago Lemos, Izabel Cristina¹; Bezerra da Cunha, Francisco Assis²; Vega Gomez, Maria Celeste³; Coronel, Cathia³; Martins da Costa, José Galberto⁴; Melo Coutinho, Henrique Douglas²; Bezerra Felipe, Cícero Francisco¹; Alencar de Menezes, Irwin Rose¹; Kerntopf, Marta Regina^{1*}

¹Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. Rua Cel. Antônio Luís, 1161, Pimenta, CEP: 63105-00. Fone:+55 (88) 3102 1212; Fax: +55(88)31021291. ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. ³Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill, Asunción-Paraguay. ⁴Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. *martareginakerntopfm@outlook.com

Recibido: 1 de diciembre de 2014

Aceptado: 14 de septiembre de 2016

Resumo. As doenças parasitárias, também chamadas de “doenças negligenciadas”, continuam sendo uma grande dificuldade para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres. Podemos citar como exemplo dessas doenças, a leishmaniose e a doença de Chagas. A leishmaniose é causada por parasitas do gênero *Leishmania* e afeta cerca de 12 milhões de pessoas. A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, causa aproximadamente 50.000 mortes por ano. Os fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças são altamente tóxicos, sendo este um dos motivos que leva à busca por drogas eficazes e seguras para seus tratamentos. As folhas da *Annona squamosa*, espécie da família Annonaceae, já foram descritas na literatura por suas atividades hepatoprotetora, antiparasitária, pesticida e antimicrobiana. Nesse estudo avaliamos a atividade anti-leishmania e tripanocida do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L. (EEAS) em formas promastigota do parasita *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar a atividade citotóxica em fibroblasto. Os resultados demonstram que o extrato apresentou uma melhor atividade contra *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* quando comparados com *Trypanosoma cruzi*; e que apresentou uma maior toxicidade nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml, com mortalidade dos fibroblastos de aproximadamente 85% e 100%, respectivamente. Esse estudo aponta para uma perspectiva terapêutica alternativa que se mostrou eficaz frente aos parasitas aqui estudados, exceto a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Com relação aos testes de citotoxicidade fazem-se necessários novos testes, uma vez que apresentou um alto nível de toxicidade, viabilizando assim futuros ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: *Annona squamosa*; Annonaceae; *Leishmania*; *Trypanosoma cruzi*

Abstract. The parasitic diseases, also calls by “neglected diseases”, continue being a major difficulty for the social and economic development of the poorest countries. We can cite as an example of these diseases, the leishmaniasis and the Chagas disease. Leishmaniasis is caused by parasites of the genus *Leishmania* and affects about 12 million people. The Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, causes approximately 50,000 deaths per year. The drugs available for the treatment of these diseases are highly toxic, being this one of the reasons that leads to the search for effective and safe drugs for their treatments. The leaves of the *Annona squamosa*, species of the family Annonaceae, have already been described in the literature by their hepatoprotective activities, antiparasitic, pesticide and antimicrobial. In this study we assessed the activity tripanocidal and anti-leishmania of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L. (EEAS) in promastigota forms of the parasite *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* and epimastigota of *Trypanosoma cruzi*, in addition to evaluating the cytotoxic activity in fibroblasts. The results demonstrate that the extract presented a better activity against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* when compared with *Trypanosoma cruzi*; and which presented a greater toxicity at concentrations of 500 and 1000 µg/ml, with mortality of fibroblasts of approximately 85% and 100%, respectively. This study points to an alternative therapeutic perspective that showed effective against the parasites here studied, except the epimastigota form of *Trypanosoma cruzi*. With relation to cytotoxicity tests are required new tests, once presented a high level of toxicity, thus enabling future *in vivo* assays.

Keywords: *Annona squamosa*; Annonaceae; *Leishmania*; *Trypanosoma cruzi*

Introdução

As doenças parasitárias continuam sendo uma grande dificuldade para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres e costumam serem chamadas de “doenças negligenciadas”, “doenças órfãs” e/ou “doenças tropicais” (Nwaka e Ridley 2003). As doenças negligenciadas continuam a existir por conta das deficiências do conhecimento científico; como também dificuldades enfrentadas pelo mercado, os altos custos de medicamentos ou vacinas e devido às dificuldades de planejamento enfrentadas na saúde pública, medicamentos baratos ou mesmo gratuitos que não são utilizados (Morel 2006). Tem-se como exemplos de doenças negligenciadas, a doença de Chagas e a leishmaniose (Ministério da Saúde 2010).

A leishmaniose é uma doença que pode acometer homens, mulheres e crianças em muitos países por todo o mundo e que afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas. Essa parasitose pode ter vários sintomas clínicos e se apresentar nas formas: cutânea, mucocutânea ou visceral. A Leishmaniose cutânea é a manifestação clínica mais comum e a forma visceral é mais grave, em que os órgãos vitais do corpo são atingidos (WHO 2013). É causada por parasitas do gênero *Leishmania*, possui ciclo de vida heteroxênico, e têm duas formas morfológicas, promastigota e amastigota (Michalick 2003).

Outra doença parasitária, bastante difundida, é a doença de Chagas. Foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um dos grandes problemas sociais e econômicos enfrentados na América Latina. É causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia. Chega a causar aproximadamente 50.000 mortes por ano, sendo que outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contágio (Gelb e Hol 2002; Engels e Savioli 2006).

A história da terapêutica experimental destas doenças tem sido caracterizada por sucessos e fracassos. No tocante a doença de Chagas duas drogas tem relevante destaque, o nifurtimox e o benznidazol, entretanto estes fármacos sofrem influências diretas de algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, dentre outros (Dias *et al.* 2009). No caso das leishmanioses cutânea e visceral, mes-

mo com sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes têm sido usados como drogas de primeira escolha para tratamento. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine são drogas de interesse por representarem novas alternativas terapêuticas, porém apresentam significativos problemas como efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação (Pereira *et al.* 2011).

A *Annonaceae* é uma família com distribuição predominantemente tropical, que inclui 130 gêneros e 2200 espécies. No Brasil ocorrem 33 gêneros e cerca de 250 espécies. As *Annonaceae* ocorrem em praticamente todas as formações naturais do Brasil, com destaque para *Xylopia aromatica* (pimenta-de-macaco) e *Annona crassiflora* (marolo) nos cerrados, que servem como fonte de renda para populações locais. A pinha-ata ou fruta do conde (*Annona squamosa*) e a graviola (*Annona muricata*) são espécies originárias da América Central, frequentemente cultivadas no Brasil, em especial no Nordeste, com frutos que são consumidos in natura ou na forma de sucos e sorvetes (Souza e Lorenzi 2008).

O gênero *Annona* inclui aproximadamente 140 espécies tropicais com várias espécies nativas sendo conhecidas popularmente por fruta-do-conde, pinha, graviola, beribá e cabeça de negro. As espécies mais comuns no Brasil são *Annona muricata*, *Annona cherimola*, *Annona coriacea*, *Annona reticulata*, *Annona tenuiflora* e *Annona squamosa* (Hiruma-Lima e Di Stasi 2003). As folhas da *Annona squamosa* foram descritas na literatura tendo como propriedades as atividades: hepatoprotetora (Raj *et al.* 2009); antiparasitária (Fernandes *et al.* 2009); pesticida e antimicrobiana, sendo que sua atividade antimicrobiana está relacionada a presença de flavonóides (Kotkar *et al.* 2001; Patel e Kumar 2008). Este trabalho tem como objetivo avaliar atividade anti-*Leishmania* e tripanocida do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L. em formas promastigota do parasita *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar a atividade citotóxica em fibroblasto.

Metodologia

Material botânico

As folhas da espécie *Annona squamosa* utilizadas em nossos experimentos foram coletadas no Distrito Ponta da Serra situado no

município de Crato-CE. Uma amostra representativa da espécie, contendo flor e fruto, foi depositada e identificada no Herbário Cariariense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri-URCA, sob o registro #5539.

Preparação do extrato

O extrato etanólico foi obtido pelo método de extração exaustiva à frio (Matos 1997). Foram utilizadas folhas frescas de *Annona squamosa* (275 g), que foram previamente trituradas e submetidas à extração com etanol P.A. por 72 h. Em seguida o solvente foi destilado em evaporador rotativo a 80° C sob pressão reduzida, sendo o extrato bruto obtido pesado (10,2g) e armazenado a temperatura ambiente.

Linhagens celulares utilizadas

Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner *et al.* 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável com o gene para a β -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panamá). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne *et al.* (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania* spp. foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. seguiram os procedimentos descritos por Roldos *et al.* (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando as linhagens de *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) e *L. infantum* (MHOM/ES/92/BCN83), cultivadas a 22 °C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100

U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón *et al.* 2006).

Reagentes

Resazurina sódica foi obtida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4 °C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1%, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0,9% (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

Teste de atividade antiepipimastigota

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega *et al.* (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de 1×10^5 mL⁻¹ em 200 μ L de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 μ g/mL a 28 °C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 μ L da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μ M. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6 h a 37 °C e foram submetidas a visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepipimastigota (AE%).

Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivadas até uma concentração de 106 células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72 h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado.

Tabela 1. Atividade antipromastigota *L. infantum* e *L. brasiliensis*, atividade antiepipimastigota *T. cruzi* e citotoxicidade.

Extrato	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	%AP (<i>L. infantum</i>)	$\pm\text{DS}$	%AP (<i>L. brasiliensis</i>)	$\pm\text{DS}$	%AE (<i>T. cruzi</i>)	$\pm\text{DS}$	%AF	$\pm\text{DS}$
EEAS	1000	95,07	2,12	98,06	0,00	27,88	2,14	100	1,42
	500	83,30	0,40	58,97	0,00	19,21	1,96	84,88	0,69
	250	66,59	1,15	55,40	1,11	17,29	1,42	48,66	0,90
	125	39,44	2,16	43,72	1,26	8,81	2,12	36,02	1,18

EEAS – Extrato Etanólico de *Annona squamosa*; AP – Atividade Antipromastigota; DS – Desvio Padrão; AE – Atividade Antiepipimastigota; AF – Atividade Antifibroblastos.

Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μL , sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 μL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorvância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

Análise estatística

A concentração efetiva (CE_{50}) e concentração letal (CL_{50}) foram calculadas pelo software Probitos Tsk version 1.5.

Resultados

A atividade citotóxica, anti-*Leishmania* e tripanocida do EEAS são exibidas na Tabela 1. O extrato apresentou uma maior toxicidade nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$, com mortalidade dos fibroblastos de aproximadamente 85% e 100%, respectivamente.

No tocante à avaliação da atividade antiparasitária, o EEAS foi testado nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$. Obtivemos uma melhor atividade contra as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. brasiliensis*

nas concentrações de 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$, com uma taxa de mortalidade de 83,30 e 95,07% de *L. infantum*, respectivamente, e de 58,97 e 98,06% de *L. brasiliensis*, respectivamente. Já frente a *T. cruzi*, obtivemos um maior percentual de mortalidade na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$, o qual matou 27,88% dos parasitas. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

Na análise estatística, calculamos os valores da CE_{50} do EEAS frente aos parasitas *L. infantum* e *L. brasiliensis* e obtivemos os seguintes valores: 186,61 $\mu\text{g/ml}$ e 284,73 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Já referente à *T. cruzi*, não foi possível calcular a CE_{50} devido os baixos percentuais de mortalidade nas concentrações testadas. Outro valor calculado foi o da CL_{50} frente aos fibroblastos, onde observamos que a CL_{50} do EEAS é de 260,14 $\mu\text{g/ml}$.

Discussão

Os produtos naturais oferecem novas fontes e perspectivas na busca de novos compostos com potencial clínico-terapêutico. Pesquisas com fitoterápicos tem revelado o grande potencial na busca de novas substâncias para combater as doenças negligenciadas (Rondon *et al.* 2012) dentre elas, a doença de Chagas e a leishmaniose (ministério da Saúde 2010). Entretanto, para que novos fármacos sejam disponíveis para o tratamento dessas doenças em humanos é necessário que se faça uma avaliação prévia desses compostos *in vitro* e *in vivo* (Soares-Bezerra

et al. 2004), os quais são executados em diferentes etapas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), para que um candidato seja testado *in vivo*, inicialmente devemos submetê-los a ensaios *in vitro* de citotoxicidade e atividade antiparasitária, após realizar essa primeira triagem os resultados devem ser analisados para definir essa possibilidade (Dias et al. 2009).

Os resultados demonstram que o extrato etanólico de *Annona squamosa* apresentou uma melhor atividade contra *L. infantum* e *L. brasiliensis* quando comparados com *T. cruzi*. O extrato, numa concentração de 250 µg/ml, apresentou um percentual de mortalidade de *L. infantum* e *L. brasiliensis* de 66,59 e 55,40%, respectivamente, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de 250 µg/mL é considerado clinicamente relevante (Rosas et al. 2007). Outras espécies do gênero *Annona* já foram descritas na literatura por possuir atividade leishmanicida, podemos citar como exemplo, *Annona muricata* (Vila-Nova et al. 2011), *Annona mucosa* (De-Lima et al. 2012) e *Annona cornifolia* (Lima et al. 2014).

Levando a expressividade dos resultados tripanocidas, vale ressaltar que embora o extrato em questão não tenha apresentado resultado favorável, tal qual apresentou sobre as espécies de *Leishmania*, já foram evidenciados vários metabólitos secundários de diferentes padrões estruturais que têm se mostrado ativo contra *T. cruzi* (Saúde-Guimarães e Faria 2007); a triagem de extratos de plantas é uma estratégia válida, sendo explorados para descobrir agentes tripanocidas (Luize et al. 2006; Pizzolatti et al. 2008).

Um importante critério na procura por compostos ativos com atividade tripanocida e leishmanicida é a avaliação da citotoxicidade em células do hospedeiro. A atividade citotóxica de outras plantas foram avaliadas em diferentes modelos de células humanas, tais como: linfócitos humanos (Reyes-Chilpa et al. 2008), células MRC-5 (Cabral et al. 2010) e macrófagos peritoneais (Houghton et al. 2007). Os resultados obtidos apontam para uma perspectiva terapêutica alternativa que se mostrou eficaz frente aos parasitas aqui estudados, exceto a forma epimastigota de *T. cruzi*. Com relação aos testes de citotoxicidade fazem-se necessários novos testes, uma vez que apresentou alto nível de toxicidade, viabilizando assim futuros ensaios *in vivo*.

Referências

Buckner F.S., Verlinde C.L., La Flamme A.C., Van Voorhis W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2592–2597.

Cabral M.M.O., Barbosa-Filho J.M., Maia G.L.A., Chaves M.C.O., Braga M.V., De-Souza W., SOARES, R. O. Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2010;124:319-324.

De-Lima J.P.S., Pinheiro M.L.B., Santos A.M.G., Pereira J.L.S., Santos D.M.F., Barison A., Silva-Jardim I., Costa E.V. *In vitro* Anti-*Leishmanial* and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.* 2012;4(6):692-702.

Dias L.C., Dessoy M.A., Silva J.J.N., Thiemann O.H., Oliva G., Andricopulo A.D. Chemotherapy of Chagas Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quimica Nova.* 2009;32:2444 – 2457.
Engels D., Savioli L. *Trends Parasitol.* 2006;22:363.

Fernandes M.Z.L.C.M., Fernandes R.M., Brito D.R.B., Borba H.R. Efeito anti-helmíntico dos extratos aquosos e etanólicos da *Annona squamosa* L. (Fruta-do-conde) sobre o nematóide *Ascaridia galli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2009;11(2):124-129.
Gelb M.H., Hol W.G. *Sciencel.* 2002.

Hiruma-Lima C.A., Di Stasi L.C. Magnoliales medicinais. In: Guimarães M.E., Santos M.N., Di Stasi L.C., Hiruma-Lima C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.* 2ªed., São Paulo: UNESP; 2003. p. 89-109.

Houghton P.J., Howes M.J., Lee C.C., Steventon G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:391-400.

Kotkar H.M., Mendki P.S., Sadan S.V.G.S., Jha S.R., Upasani S.M., Maheshwari V.L. Antimicrobial and Pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Management Science.* 2001;58.

- Le Senne A., Muelas-Serrano S., Fernandez-Portillo C., Escario J.A., Gómez-Barrio A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1101-1105.
- Lima L.A.R.S., Alves T.M.A., Zani C.L., Sales-Júnior P.A., Romanha A.J., Johann S., Cisalpino P.S., Pimenta L.P.S., Boaventura M.A.D. *In vitro* cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). An. Acad. Bras. Ciênc. 2014;6(2).
- Luize P.S., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B.P., Cortez D.A.G., Nakamura C.V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallidum* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. Biol Pharm Bull. 2006;29:2126-2130.
- Matos F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.
- Michalick M.S.M. GÊNERO *Leishmania*. En: Neves D.P., Melo A.L., Genaro O., Linardi P.M. Parasitologia humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 31-35.
- Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Revista de Saúde Pública. 2010;44(1):200-202.
- Morel C.M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. Cadernos de Saúde Pública. 2006;22(8).
- Nwaka S., Ridley R.G. Nature Rev. Drug Discov. 2003;2:919.
- Patel J.D., Kumar V. *Annona squamosa* L.: Phytochemical analysis and Antimicrobial Screening. Journal of Pharmacy Research. 2008;1:34-38.
- Pereira I.O., Sacramento L.V.S., Marques M.J. Leishmanioses: o estado da arte. Revista da Universidade Vale do Rio Verde. 201;9(1):220-238.
- Pizzolatti M.G., Mendes B.G., Cunha-Júnior A., Soldi C., Koga A.H., Eger I., Grisard E.C., Steindel M. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennet (Polygalaceae). Rev Bras Farmacogn. 2008;18:177-182.
- Raj D.S., Vennila J.J., Aiyavu C., Panneersekvam K. The hepatoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on experimentally induced liver injury in swiss albino mice. International Journal of Integrative biology. 2009;5:182-186.
- Reyes-Chilpa R., Estrada-Muñoz E., Veja-Avila E., Abe F.: Kinjo J., Hernández-Ortega S. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mamea-type coumarins. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:431-436.
- Rodon F.C.M., Bevilaqua C.M.L., Accioly M.P., Morais S.M., Andrade Júnior H.F., Carvalho C.A., Lima J.C., Magalhães H.C.R. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2012;21(3):185-191.
- Roldos V., Nakayama H., Rolón M., Montero-Torres A., Trucco F., Torres S., Veja C., Marrero-Ponce Y., Hagueburu V., Yaluff G., Gómez-Barrio A., Sanabria L., Ferreira M.E., Rojas de Arias A., Pandolfi E. Activity of a hydroxybenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi*: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. Eur J Med Chem. 2008;43:1797-1807.
- Rolón M., Seco E., Vega C., Nogal J.J., Escario J.A., Gómez-Barrio A., Malpartida F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28: 104-109.
- Rosas L.V., Cordeiro M.S.C., Campos F.R., Nascimento S.K.R., Januário A.H., França S.C., Nomizo A., Toldo M.P., Albuquerque S., Pereira P.S. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Braz J Med Biol Res. 2007;40:663-670.
- Saúde-Guimarães D.A., Faria A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:455-465.

Soares Bezerra R.J., Leon L., Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2004;40(2).

Souza V.C., Lorenzi H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2ª Ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. p. 640.

Vega C., Rolón M., Martínez-Fernández A.R., Escario J.A., Gómez-Barrio A.A. New pharmacological screening assay with *Trypanoso-*

ma cruzi epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res*. 2005;95:296-298.

Vila-Nova N.S., Morais S.M., Falcão M.J.C., Machado L.K.A., Beviláqua C.M.L., Costa I.R.S., Brasil N.V.G.O.S., Andrade-Júnior H.F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2011;44(5).

World Health Organization (WHO). 2013. Leishmaniasis. [em linea] [Acessada em 10 dezembro 2013]. Disponível em: <<http://www.who.int/Leishmaniasis>>.

**Determinación de etilentiourea en acelgas tratadas con Zineb.
Efecto del calor húmedo por ebullición
Determination of ethylenethiourea in chard treated with Zineb.
Effect of wet heat by boiling**

Ríos, Francisco Teodoro; Wierna, Norma Rosario; Ruggeri, María Alejandra; Bovi Mitre María Graciela*

Grupo INQA. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Jujuy. Alberdi 47. 4600. San Salvador de Jujuy. Jujuy. Argentina. Te/Fax 0388 4233014

*gbovi@imagine.com.ar

Recibido: 25 de febrero de 2016

Aceptado: 24 de agosto de 2016

Resumen. El Zineb es un plaguicida perteneciente a la familia de los etilenbisditiocarbamatos (EBDC) ampliamente utilizado en la provincia de Jujuy (Argentina). La toxicidad de este fungicida está dada por la etilentiourea (ETU) que es el principal producto de su degradación. La ETU tiene efectos mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos en animales. La EPA la clasifica como probable cancerígeno humano. El objetivo del trabajo fue determinar la transformación del Zineb a ETU en acelgas cultivadas en Jujuy, por efecto del calor húmedo por tratamiento térmico. El método se basó en la extracción de la ETU con agua y su posterior reextracción con diclorometano a pH alcalino. El extracto se purificó por cromatografía en columna de alúmina y la ETU se cuantificó por HPLC con un detector UV-Visible a 232 nm. Para cumplir con el objetivo planteado se realizó un cultivo experimental de acelgas a las que se aplicó el fungicida Zineb, el cual luego se cuantificó a diferentes periodos de tiempo. La ETU se cuantificó con y sin aplicación de calor húmedo. La concentración de ETU en las acelgas sometidas a tratamiento térmico fue de 8,07 mg/kg y transcurridos 30 días disminuyó a 0,05 mg/kg, lo que representa una disminución de más del 99 % respecto a la concentración inicial. Simultáneamente, se determinó la concentración de Zineb en las acelgas y se obtuvo, inicialmente, 44 mg/kg y luego de 36 días la concentración de Zineb disminuyó a 3,83 mg/kg, lo que representa una disminución del 91 % respecto a la concentración del plaguicida al inicio. La detección de ETU en acelgas sometidas a tratamientos térmicos confirma la transformación del fungicida Zineb a un producto de degradación clasificado según el IARC en el grupo 3. Esto pone en discusión la reglamentación Argentina vigente, por cuanto al finalizar los tiempos de carencia no se evalúan la presencia de metabolitos o productos de degradación potencialmente tóxicos.

Palabras clave: Etilentiourea; Zineb; Acelgas; Tratamiento térmico

Abstract. Zineb is a pesticide belonging to the family of ethylenebisdithiocarbamates (EBDC) widely used in the province of Jujuy, Argentina. The toxicity of this fungicide is given by the ethylenethiourea (ETU) which is the main product of degradation. The ETU has mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects in animals. The EPA classifies it as a probable human carcinogen. The aim of the study was to determine the transformation of Zineb to ETU in cultivated chards in Jujuy, by treatment with humid heat. The method is based on extraction of ETU with water and subsequent extraction of the aqueous phase with dichloromethane. The extract was cleaned by alumina column chromatography and the ETU was quantified by HPLC with a UV-Visible detector at 232 nm.

An experimental cultivation of chards was carried out and the Zineb fungicide was applied and then quantified at different time periods. The ETU was quantified with and without application of moist heat.

The concentration of ETU in heat treated chards was 8.07 mg/kg and after 30 days decreased to 0.05 mg/kg, representing a decrease of more than 99 % over the initial concentration. Simultaneously, Zineb concentration in chard was initially determined as 44 mg/kg and, 36 days later, the Zineb concentration decreased to 3.83 mg/kg, representing a 91% decrease with respect to the concentration of the pesticide at the beginning.

Detection of ETU in chards subjected to heat treatment confirms the transformation of the fungicide Zineb to a degradation product classified by the IARC as group 3. This puts into discussion the current Argentine regulations since, at the end of the deficiency times the presence of potentially toxic metabolites or degradation products is not evaluated.

Key words: Ethylenethiourea; Zineb; Chards; Heat treatment

Introducción

Los fungicidas son usados extensamente en la industria, en la agricultura, en el hogar y en el jardín para distintos propósitos que incluyen: la protección de las semillas durante su almacenamiento, transporte y germinación; la protección de los cultivos, hierbas silvestres, frutas y flores, tanto durante su almacenamiento como durante su transporte. En cuanto al hogar, pueden ser utilizados para la eliminación de los mohos que atacan las superficies pintadas, así como la protección de alfombras y telas.

El Zineb es un fungicida del grupo de los etilenbisditiocarbamatos (EBDC) y, según la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), su nombre es etilenbisditiocarbamato de zinc. Los fungicidas EBDC son metabolizados a etilentiourea (ETU) en organismos vivos y también degradados a ETU en el medio ambiente (Rossi Lemes y col. 2014). El nombre químico de la ETU es imidazolina-2-tiona. Su fórmula química es $C_3H_6N_2S$ y tiene una masa molar de 102,2 g/mol.

La ETU también se puede formar durante la manufactura de estos fungicidas y se encuentra como impureza en los productos formulados (Saltamiras y Lemley 2000). El proceso de degradación de los EBDC a ETU se ve favorecido durante el almacenamiento, por tratamiento a altas temperaturas y por cocción de los alimentos (Hwang y col. 2002); además influyen en esta degradación el oxígeno disponible (Marshall 1997) y el pH (IARC 2001).

Se ha estudiado la descomposición química de los EBDC a temperatura ambiente bajo distintas condiciones. Los productos de degradación son, entre otros el disulfuro de carbono (CS_2), sulfuro de hidrógeno (H_2S), etilendiamina (EDA), etilentiourea (ETU), etilen-tiuram-disulfuro (ETM), etilen-tiuram-monosulfuro (ETD), azufre elemental (Marshall 1997), etilenobis (isotiocianato) sulfuro (EBIS) y etilenurea (EU) (Garcinuño y col. 2004). En condiciones ácidas el principal producto es la EDA y CS_2 , mientras que en condiciones neutras y alcalinas es favorecida la transformación a ETU (Lasage 1980). La ETU es el principal metabolito de la hidrólisis de los EBDC. Se ha demostrado que los EBDC son teratogénicos, cancerígenos y mutagénicos en pruebas con animales y además tienen un efecto antitiroideo (Mnif y col. 2011), por otra parte la ETU induce daños al ADN, riñón, pulmón y bazo en ratones (Saltamiras y Lemley 2000; Mora y Rodríguez 2002). La ETU es clasificada dentro de la categoría 1 (sustan-

cias para las cuales la actividad endócrina se ha documentado en al menos un estudio en un organismo vivo. A estas sustancias se les da la más alta prioridad para estudios posteriores) por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Dinamarca.

La DL_{50} de la ETU es de 1832 mg/kg en ratas. La ETU ha sido clasificada en el grupo IIB por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) como un probable cancerígeno humano en base a las evidencias de los estudios en animales (Hwang y col. 2001), mientras que para la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) está clasificada en el grupo 3 (no carcinógeno para humanos), aunque el programa Nacional de Toxicología de U.S. considera que es razonable anticipar a la ETU como cancerígeno humano (Panganiban y col. 2004).

Kontou y col. (2004) estudiaron el efecto de la temperatura en la degradación del Maneb, el etilenbisditiocarbamato de manganeso, en el rango de 50-90 °C. Por estos estudios se conoce que la mayor formación de ETU se produce en los primeros 15 minutos de calentamiento y que a altas temperaturas, más rápida y mayor es la degradación del Maneb. A 90 °C, la conversión a ETU en pH alcalino es mucho más alta que la conversión a pH ácido (Kontou y col. 2004).

La ETU es estable en solución acuosa en un rango de pH 5 a 9 (Kontou y col. 2001).

El valor máximo permitido de residuos de ETU en productos agrícolas es de 0,05 mg/kg según normas de la Unión Europea. El programa de monitoreo de la *Food and Drugs Administration* (FDA) establece 10 ng/g como residuo máximo de ETU en alimentos (Tran y col. 2013). La legislación Argentina no establece un valor de límite máximo de residuo para ETU.

Investigaciones realizadas en la provincia de Jujuy, por el Grupo Investigación Química Aplicada (INQA) de la Universidad Nacional local detectaron el uso de fungicidas de la familia de los EBDC (Bovi Mitre y Bardón 1998). Entre los productos más usados se encontraron: Mancozeb, Maneb y Zineb (Wierna y col. 2001). Se detectaron residuos de Zineb en el 63 % (N= 164) de las muestras de tomates, siendo los valores encontrados en los mercados tres veces mayores a los registrados en las verdulerías (Bovi Mitre y col.1998). En el período 2003-2004 se analizaron espinacas comercializadas en la capital de la provincia y en el 100 % de las muestras se detectaron residuos de

Zineb (Wierna y col. 2005).

Con estos datos, surge la necesidad de investigar si se genera la ETU en hortalizas de consumo masivo tratadas con Zineb.

El objetivo del trabajo fue determinar la transformación del Zineb a ETU en acelgas cultivadas y tratadas con el fungicida en Jujuy (Argentina), sometidas a cocción en agua, ya que la degradación del fungicida a ETU se ve favorecida durante el procesamiento a altas temperaturas.

Materiales y métodos

Reactivos y equipos

Se trabajó con un patrón de etilentiourea marca Sigma Aldrich (Pestanal).

El producto comercial utilizado en el cultivo de acelgas fue el Zineb 70 %.

Para la determinación de ETU se usó carbonato de sodio decahidratado, sulfato de sodio anhidro y alúmina neutra de grado analítico Merck, metanol grado HPLC y diclorometano grado analítico Merck.

Las cuantificaciones de ETU fueron realizados con un cromatógrafo líquido de alta performance (CLAP) equipado con un inyector Rheodyne y un detector UV 6000LP con arreglo de diodos (180-800 nm). Los datos fueron procesados con un software ChromQuest 4,1. Se usó una columna C₁₈ (5 µ), longitud 250 mm por 4,6 mm de diámetro interno.

Se preparó el estándar primario de 100 mg/L de ETU en fase móvil (agua/metanol, 95/5) y se hicieron diluciones en un intervalo de concentraciones entre 0,05 a 10 mg/L. Se construyeron dos curvas de calibración con rangos que van de 0,05 a 1 mg/L y de 1 a 10 mg/L.

La técnica analítica que se usó para la determinación de Zineb por espectrofotometría es la desarrollada por Keppel (1971).

Cultivo experimental

Se trabajó con acelgas (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae), cultivadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy (UNJu). El suelo se preparó en forma manual. Se usaron plantines y se colocaron cinco plantas por raya (líneas sencillas) a una distancia aproximada entre ellas de 0,25 cm, el espacio entre líneas fue de 50 cm. Se utilizó riego por goteo. Para el diseño experimental se dividió la plantación en 5 bloques de 3,5 m² cada uno (Figura 1).

La aplicación del plaguicida en los bloques I, II, III y IV se realizó a una concentración de 2 gra-

mos por litro (dosis recomendada por la guía fitosanitaria-CASAFE) del producto comercial Zineb 70 %, con una mochila Manual Jacto de 20 litros tratando de repetir las prácticas de los pequeños productores de la región.

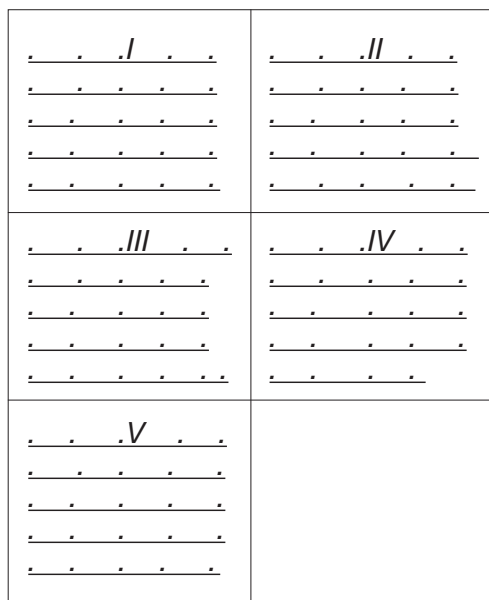


Figura 1. Bloques en los que se dividió el cultivo experimental

En la puesta a punto y validación de la técnica, se utilizó acelgas del bloque V que no recibió aplicación del fungicida. El patrón de ETU se usó como estándar externo en las hortalizas utilizadas como blanco.

La recolección de las muestras se realizó de forma aleatoria de todos los bloques excepto el V, utilizando la hoja y eliminando su tallo para la cuantificación.

Técnica analítica

Se eligieron en forma aleatoria cinco hojas de acelga con buen desarrollo, se cortaron, homogeneizaron y pesaron 50 g. Se sometieron a calor húmedo por ebullición durante 30 minutos, se agregó 30 mg de carbonato de sodio. La ETU disuelta en agua se reextrajo tres veces con porciones de 100 mL de diclorometano. Se concentró en rotavapor a 45 °C y 80 revoluciones por minuto. Debido a que la ETU es un compuesto altamente polar tiene un bajo coeficiente de partición en diclorometano por lo que es indispensable agregar el carbonato de sodio para su remoción cuantitativa de la fase acuosa.

El extracto del diclorometano se sometió a clean up por cromatografía en columna, usando 50 mL de diclorometano/metanol 99/1(v/v). La columna se preparó con 5 g de alúmina desactivada/agua (95/5) y aproximadamente 1 g de sulfato de sodio.

La ETU se cuantificó por HPLC con un detector UV-visible a 232 nm, siendo la fase móvil agua/metanol (95/5). Las condiciones en las que se realizaron las corridas cromatográficas fueron: flujo isocrático 0,8 mL/min; $\lambda = 232$ nm y un volumen de inyección de 20 μ L. (Ríos y col. 2008)

Tratamiento de la muestras

Para estudiar el efecto del calor húmedo por ebullición en la transformación del Zineb a ETU, se trabajó con las acelgas tratadas con el fungicida y recolectadas a partir del primer día de aplicado el Zineb.

Se cuantificó ETU hasta 30 días después de aplicado el plaguicida. Simultáneamente se investigó la presencia de ETU en muestras del mismo cultivo sin someterlas a la etapa de calentamiento descrito en el método analítico.

Se analizaron por duplicado y se hicieron tres inyecciones en el HPLC de cada una de ellas. Las concentraciones de ETU en acelgas registradas en las tablas son promedios.

Estabilidad de un patrón de ETU

Para determinar la estabilidad de la ETU se preparó un estándar de 10 mg/L. Una alícuota se refrigeró a 7 ± 2 °C, otra se congeló a -27 ± 1 °C, una tercera se dejó en condiciones ambientales protegida de la luz y una cuarta alícuota se conservó a temperatura ambiental sin protección. Se determinó la concentración de ETU a diferentes intervalos de tiempo, en las cuatro alícuotas.

Resultados y discusión

Curvas de calibración

El límite de detección (LD) obtenido fue de 0,015 mg/L y el límite de cuantificación (LC) de 0,05 mg/L.

Para determinar la recuperación del método se utilizaron acelgas que no recibieron tratamientos con plaguicidas (*bloque V de la Figura 1*). Se trabajó con dos muestras por duplicado, enriquecidas con 0,0010 g de ETU/50 g de acelga. La recuperación del método fue del 94 %.

Para la determinación de la recuperación del método en los análisis de Zineb se trabajó con

dos muestras por duplicado de acelgas a las que se adicionaron 0,0010 g de Zineb comercial/ 100 g de acelga. El valor obtenido fue de 86,4 %.

Estabilidad de un patrón de ETU

Los resultados obtenidos en esta investigación, que demuestran la estabilidad de la ETU (*tabla 1*) en la fase móvil durante 62 días, sin refrigeración y sin protección a la luz, están de acuerdo con las investigaciones de Newsome y Laver (1973) que demostraron esta propiedad del tóxico en aguas, tanto superficiales como profundas.

Tabla 1. Estabilidad de la ETU a distintas condiciones de almacenamiento.

Condiciones de ensayo	Estabilidad en días
Refrigeración ($7 \pm 2^\circ$ C)	68
Freezado ($-27 \pm 1^\circ$ C)	36
Condiciones ambientales con protección de la luz artificial	49
Condiciones ambientales sin protección de la luz artificial	62

Determinación de ETU en el producto comercial

En el producto comercial utilizado en las aplicaciones (Zineb 70 %) se detectó una contaminación con ETU en una concentración del 1,05 mg de ETU/g de Zineb comercial, es decir el 0,1 % es ETU. Este resultado es menor aún al descrito por Jacobsen y Bossio (1997) que registraron a la ETU como una impureza en el grupo de los EBDC en un porcentaje cercano al 10 %. Saltamiras y Lemley (2000), describen brevemente las restricciones internacionales en el uso de los EBDC, generadas en torno a este hallazgo.

Concentraciones de ETU y Zineb en las acelgas tratadas con el plaguicida y sometidas al tratamiento térmico

En la *Tabla 2* se registran los datos de las concentraciones de ETU en las hortalizas analizadas con una etapa de ebullición con calor húmedo y las concentraciones de Zineb en las acelgas del cultivo experimental.

Se observó que las concentraciones de ETU disminuyen en el tiempo lo que coincide con

la disminución del contenido del fungicida en las hojas tratadas.

Tabla 2. Concentraciones de ETU y Zineb a partir del primer día de aplicado el fungicida.

Muestra	Recolección (días)	ETU (mg/kg)	Zineb (mg/kg)
M1	1	8,07	44
M2	8	7,52	37,20
M3	16	1,49	26,83
M4	23	0,43	19,54
M5	30	0,05	13,91
M6	36	≤0,05	3,83

Los valores de ETU disminuyeron de 8,07 hasta 0,05 mg/kg transcurridos 30 días de la aplicación, en análisis posteriores a esta fecha no se detectó ETU. Los valores de Zineb disminuyeron de 44 mg/kg a un valor de 3,8 mg/kg a los 36 días. Se observó en estos datos una tendencia similar a los resultados publicados por Trotter y Pardue (1982) quienes detectaron concentraciones de Zineb que van desde 80 a 5,2 mg/kg, mientras que, las concentraciones de ETU varían de 2,3 a 0,12 mg/kg.

El valor de 3,8 mg/kg de Zineb a los 36 días es cercano a las 3 mg/kg de Zineb, que es el límite máximo de residuos (LMR) establecido por la legislación Argentina y está muy por encima de los 0,05 mg/kg, correspondiente al LMR para Zineb establecido por la Unión Europea. La legislación establece como tiempo de carencia 15 días.

Según esta investigación el LMR se alcanza después de 36 días de aplicación del fungicida. Datos como estos ponen la urgencia de discutir y establecer los límites máximos de residuos y los tiempos de carencia.

Son múltiples los estudios que describen la toxicidad asociada a la exposición simultánea a los EBDC y a su metabolito ETU. Así Nebbia y Fink-Gremmels (1996) y Mnif y col. (2011), describen los efectos adversos aún a bajas dosis de Zineb y ETU en la función tiroidea de animales de experimentación, datos que sirven para reglamentar restricciones en el uso de estos plaguicidas.

En la *Tabla 3* se describen los resultados de los

contenidos de ETU en las muestras analizadas con una etapa de ebullición con calor húmedo y muestras analizadas sin calentamiento. Se observa que, en las muestras procesadas sin calentamientos, no se detecta ETU lo que estaría indicando que la contaminación del producto comercial con este tóxico es prácticamente despreciable y no aparece en las hojas de la hortaliza sin cocción. También estaría indicando, en coincidencia a lo descrito por Hwang y col. (2001), que la velocidad de degradación de la ETU generada a partir de los EBDC es mayor que la velocidad de su formación como producto de su metabolización.

Tabla 3. Concentraciones de ETU en acelgas que fueron procesadas siguiendo la técnica analítica completa (con calentamiento) y aquellas a las que no se las sometió a calentamiento.

Muestra	Recolección (días)	ETU (mg/kg) (sin calentamiento)	Zineb (mg/kg) (con calentamiento)
M1	1	ND	8.07
M2	8	ND	7.52
M3	16	ND	1.49
M4	23	ND	0.43
M5	30	ND	0.05
M6	36	ND	≤0,05

De los datos obtenidos se puede concluir, además, que hasta los 30 días las hortalizas sometidas a calor húmedo por ebullición están contaminadas con residuos de Zineb y de ETU.

Las hortalizas que no son sometidas a un tratamiento térmico sólo presentan residuos de Zineb.

Conclusiones

En las hojas de acelgas tratadas experimentalmente con Zineb en una dosis de 2 g/L, se detectaron residuos de éste plaguicida hasta 36 días después de aplicado. Este resultado advierte que a pesar de usar la dosis recomendada (2 g/L) el tiempo de carencia establecido por la legislación argentina (15 días) no coincide con datos empíricos de la región NOA (36 días).

La cuantificación de ETU en las hojas de acelgas tratadas con Zineb y sometidas a calor

húmedo advierte la presencia de este tóxico a concentraciones tan altas como 8 mg/kg inmediatamente de aplicado el fungicida y una permanencia en la hortaliza hasta 30 días después.

Se deben incorporar en las discusiones relativas a plaguicidas, las consideraciones sobre la generación de metabolitos o productos de degradación que ejerzan un efecto adverso en el hombre y su entorno, así como la estabilidad que tienen en el ambiente.

Recomendaciones

Queda en discusión la reglamentación Argentina vigente en cuanto a los tiempos de carencia los cuales, indefectiblemente, deben determinarse experimentalmente, ya que están muy alejados de la realidad, son demasiado cortos frente a la permanencia de tóxicos en los cultivos. Se recomienda revisar la reglamentación respecto a los LMR establecidos en Argentina ya que son valores más altos que los establecidos en legislaciones internacionales e incorporar la discusión de metabolitos y productos de degradación de los plaguicidas que se generan en productos alimenticios.

No es suficiente establecer dosis recomendadas en el manejo de agroquímicos en cultivos de uso masivo.

Bibliografía citada

Agencia Internacional para Investigación de Cáncer (IARC). Ethylenethiourea. Monog Eval Carc. 2001; 79 p. 659.

Bovi Mitre M.G., Bardón A. Residuos Tóxicos en Frutos. San Salvador de Jujuy (Argentina). Ed. Universidad Nacional de Jujuy, Jujuy, Argentina.1998; p. 83 .

Bovi Mitre M.G., Ruggeri M.A., Singh J., De Pascuale N., Cormenzana E., De Pascuale A. Detección de Residuos de Zineb en Tomates en San Salvador de Jujuy. Revista de Ciencia y Técnica.1998;3:17-26.

Garcinuño R.M., Fernández-Hernando P., Cámara C. Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection. J Chromatogr A. 2004;1043:225-229.

Hwang E., Cash J., Zabik M. Chlorine and Chlorine Dioxide Treatment to Reduce or Re-

move EBDCs and ETU Residues in a Solution. J Agr Food Chem. 2002; 50:734-4742.

Hwang E., Cash J., Zabik M. Postharvest Treatments for the Reduction of Mancozeb in Fresh Apples. J Agr Food Chem. 2001;498:3127-3132.

Jacobsen O.S., Bossi R. Degradation of ethylenethiourea (ETU) in oxic and anoxic sandy aquifers FEMS. Microbiol Rev. 1997;20:539-544.

Keppel G.E. Collaborative Study of the Determination of Dithiocarbamate Residues by a Modified Carbon Disulfide Evolution Method. J. Assoc. Off. Anal. Chem.1971,54,528-532.

Kontou S., Tsipi D., Oreopoulou V., Tzia C. Determination of ETU in Tomatoes and Tomato Products by HPLC-PDA. Evaluation of Cleanup Procedures. J Agr Food Chem. 2001;49:1090-1097.

Kontou S., Tsipi D., Tiza C. Kinetics of Maneb Degradation during Thermal Treatment of Tomatoes. J Agr Food Chem. 2004;52:1212-1219.

Lasage S. Ethylenebis (dithiocarbamates) by Cupric Ions in Aqueous Media. J Agr Food Chem. 1980;28:787-790.

Marshall W.D. Thermal Decomposition of Ethylenebis dithiocarbamate Fungicides to Ethylenethiourea in Aqueous Media. J Agr Food Chem.1997; p.25.

Mnif W., Hassine A.I.H., Boucziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2011;8(6):2265-2303.

Mora D., Rodríguez O.M. Optimización de un método por cromatografía líquida de alta resolución para determinar residuos de etilentiourea en muestras de tomate. Ingeniería y Ciencia Química. 2002;20:24-27.

Nebbia C., Fink-Gremmels J. Acute effects of low doses of Zineb and ethylenethiourea on thyroid function in the male rat. Bull Environ Contam Tox.1996;56:847-852.

Newsome W.H., Laver G.W. Effect of boiling on the formation of ethylenethiourea in zineb treated foods. Bull Environ Contam Tox.1973;10:151-154.

Panganiban L., Cortes-Maramba N., Dioquino C., Suplido M.L., Ho H., Rivera, F. Ethylene thiourea. In Report on Carcinogens. NTP 13th ed.; [en línea]. 2004. [consulta 24 de noviembre de 2015] Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/ethylenethiourea.pdf>.

Ríos F.T., Wierna N.R., Campos E., Saavedra O. N., Bovi Mitre M. G. Propuesta de un método modificado para determinar residuos de Etilentiourea en acelga y espinaca. *Acta Toxicol Argent.* 2008;16(supl):5-6.

Rossi Lemes V.R., Martins-Júnior H.A., Carvalho de Souza S.V., Colacioppo, S. Ethylenethiourea in fruits: Optimization and in-house validation of a method by liquid chromatography tandem mass spectrometry, occurrence and dietary exposure assessment. *Food Control.* 2014;42:321-328

Saltamiras D.A., Lemley A. Degradation of ethylenethiourea (ETU) with Three Fenton Treatment Processes. *J Agr Food Chem.* 2000;48:6149-61.

Tran K., Mactal L., Cromer R., Smith R. Development and validation of Ethylenethiourea Determination in Foods using Methanol-Based Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup and LC-MS/MS, *Food Chem.* 2013;140:340-342.

Trotter W., Pardue J. The results and Evaluation of a Limited Survey for Ethylenebisdithiocarbamate and Ethylenethiourea Residues in Correlated Raw and Canned Spinach and Tomato Samples. *J Food Safety.* 1982;4:59-68.

Wierna N., Maidana Iriarte S., Bonillo M., Bovi Mitre M. Estudio Comparativo de los Plaguicidas más usados en Jujuy, Argentina, en los últimos diez años. *Revista AIDIS. Ingeniería Sanitaria y Ambiental.* 2001;57:76-80.

Wierna N., Saavedra N., Vargas N., Campos E., Ruiz A., Ruggeri M., Bovi Mitre M. Investigación Preliminar de Residuos de Zineb en Espinaca Comercializadas en San Salvador de Jujuy. *Acta Toxicológica Argentina.* 2005;13:38-39.

Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolana* y *Psidium myrsinites* DC. A. contra peroxidación lipídica inducida por hierro II

Citoprotective effect of *Eugenia jambolana* and *Psidium myrsinites* DC. A. against the lipid peroxidation induced by iron II

Leite, Nadghia F.¹; Sobral-Souza, Celestina E.¹, Matias, Edinardo F.F.^{1,2}; Alencar, Liscássia B.B.¹; Albuquerque, Rosimeire S.¹; Morais-Braga, Maria F.B.¹; Souza, Erlanio O.³; Coutinho, Henrique D.M.^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, URCA, Crato(CE), Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212. ²Faculdade de Ciências Aplicadas Dr. Leão Sampaio, Juazeiro do Norte (CE), Brasil. ³Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

*hdmcoutinho@gmail.com

Recibido: 16 de enero de 2015

Aceptado: 14 de septiembre de 2016

Resumen. La evaluación de la actividad antioxidante ha sido una cuestión relevante teniendo en cuenta su importancia para la salud humana. Estudios recientes muestran que el uso de plantas en forma de jugos o tés como fuentes de antioxidantes naturales, que se pueden utilizar como complemento para el tratamiento de diversas enfermedades. En este contexto, evaluado el potencial antioxidante in vitro, de extractos de *Eugenia jambolana* Lam y *Psidium myrsinites* DC. A. y cuantificar fenoles y flavonoides presentes en los extractos. La peroxidación lipídica ha sido evaluada por la técnica de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). De acuerdo con los resultados, mostraron una mejor actividad antioxidante del extracto de *Psidium myrsinites* DC. A. Para poner a prueba TBARS con fosfolípido de huevo extrae redujo los niveles basales en el proceso de peroxidación de lípidos, la CI_{50} del extracto etanólico de *Eugenia jambolana* (EEFEJ) mostró los mejores resultados, con un más bajo valor de la CI_{50} en comparación con el extracto hidroetanólico de *Psidium mirsinites*, demostrado ser más efectivo. Por lo tanto, a través de estas pruebas se puede ver que los extractos de las hojas de la especie, *Eugenia jambolana* Lam y *Psidium myrsinites* DC. A., la actividad antioxidante de exposiciones, sustancias fenólicas directamente relacionados producidos a partir de su metabolismo secundario.

Palabras clave: *Eugenia jambolana*; *Psidium myrsinites* DC. A.; Metales pesados; Antioxidante

Abstract. The evaluation of the antioxidant activity has been a relevant and important issue to human health. Recent studies show that the use of plants juices or teas as sources of natural antioxidants, which can be used as an adjuvant in the treatment of several diseases. In this context, was evaluated the in vitro antioxidant potential of the extracts of *Psidium myrsinites* DC. and *Eugenia jambolana* Lam. The total of phenols and flavonoids were quantified in the extracts. Lipid peroxidation was evaluated by the technique of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). According to the results, was showed a better antioxidant activity in the extract of *Psidium myrsinites* DC. A. In the TBARS assay with egg phospholipid the extracts reduced the basal levels in the process of lipid peroxidation and the IC_{50} of ethanol extract of *Eugenia jambolana* (EEFEJ) showed the best results with a lower value of IC_{50} compared with hydroethanol extract of *Psidium mirsinites*, demonstrating be more effective. Therefore, through these tests can be seen that extracts from the leaves of the species, *Eugenia* and *Psidium jambolana* Lam myrsinites DC. A., exhibit antioxidant activity, directly related phenolic substances produced from the secondary metabolism.

Keywords: *Eugenia jambolana* Lam., *Psidium myrsinites* DC. A., Heavy metals, Antioxidant

Introducción

La evaluación de la actividad antioxidante ha sido una cuestión relevante teniendo en cuenta su importancia para la salud humana. Estudios recientes muestran que el consumo de plantas en forma de jugos o tés como fuentes de antioxidantes naturales, que se pueden uti-

lizar como una ayuda para el tratamiento de diversas enfermedades (Silva y col. 2005). Además de las enfermedades crónicas, el estrés oxidativo también puede desempeñar un papel en la hepatotoxicidad aguda de varios medicamentos, incluyendo el analgésico y antipirético paracetamol utilizado en todo el

mundo (Reid y col. 2005). Los estudios han demostrado que el uso de compuestos polifenólicos encontrados en el té, frutas y verduras se asocia con un menor riesgo de dicha enfermedad (Hertog y col. 1993). Por consiguiente, existe interés en las plantas comestibles que contienen antioxidantes y en la promoción de la salud del uso de fitoquímicos como agentes terapéuticos potenciales (Vieira y col. 1999).

El malondialdehído (MDA) ha sido el foco de atención de la peroxidación de lípidos durante muchos años, ya que puede medirse libre, usando el ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA reacciona con TBA y forma un cromógeno rosa fluorescente cuya absorción se mide a 532 nm (Thérond y col. 2000).

Las plantas medicinales tienen varios compuestos químicos con potencial antioxidante. Entre éstas, los compuestos fenólicos han recibido mucha atención, sobre todo porque tienen una comprobada acción de inhibición de la actividad de la peroxidación lipídica y la lipoxigenasa *in vitro* (Sousa y col. 2007; Sun y col. 2012).

Los antioxidantes son sustancias químicas que reaccionan con los radicales libres limitando de este modo los efectos adversos en el organismo. El cuerpo humano tiene la capacidad de producir ciertos antioxidantes endógenos, pero la mayoría de ellos provienen de los alimentos ingeridos (Borguini y Torres 2009).

La *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae), conocido como de oliva, se utiliza como un alimento y en la medicina tradicional como antimicrobiano (Holetz y col. 2002), y ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes, el potencial hipoglucémico e hipotensor (Souza y col. 2004).

Psidium myrsinites DC. A., también conocida como guayaba, tiene uso médico, ya que mejora la cicatrización de heridas, y como alimentos, en la fabricación de jugos y jaleas. Se puede encontrar en los estados de Ceará, Bahia, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Piauí y el Distrito Federal. En su aceite esencial está presente una sustancia usada en la composición de perfumes, linalol (Medio Ambiente, Brasil 2009).

Este estudio tuvo como objetivo determinar el potencial antioxidante de los extractos *in vitro* por DPPH (difenil-picrilhidrazil) y TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), y cuantificar los fenoles y flavonoides presentes en los extractos.

Materiales y métodos

Fenoles

La cantidad de fenoles se determinó mediante la adición de 200 µl de solución de extractos (300, 100, 50 y 25 mg/ml en etanol 99,6 %) a 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (10 % v/v) y se agitó durante 1 minuto. A continuación, se añadieron 800 µL de carbonato de sodio 7,5 % y se homogeneizó durante 30 segundos. Después de 1 hora se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. El blanco se determinó con todos los reactivos, pero el extracto se sustituyó por agua destilada. La prueba se realizó por triplicado. La media de tres lecturas se utilizó para determinar los fenoles expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, obteniéndose este valor mediante la interpolación de la curva patrón construida con ácido gálico estándar. La curva de calibración de ácido gálico se determinó usando diferentes concentraciones de esa sustancia (300, 100, 75, 25 y 10 mg/ml).

Flavonoides

Se prepararon soluciones de extracto (300, 200, 100 y 50 mg/ml) a los cuales se les adicionó 1 ml de cloruro de aluminio (AlCl₃) en una concentración con 2 % peso/volumen. Paralelamente se realizó un blanco con agua destilada. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió en espectrofotómetro la absorbancia a 415 nm. La prueba se realizó por triplicado, se calculó el promedio para determinar la cantidad de flavonoides totales los cuales fueron expresados en miligramos de equivalentes de quercetina/g de extracto. La curva de calibración de quercetina se determinó usando diferentes concentraciones de esa sustancia (400, 300, 200, 100, 50, 25 y 10 mg/ml) diluidos en etanol 99,6 %.

Actividad antioxidante

Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de cada extracto de *Eugenia jambolana* Lam. y *Psidium myrsinites* DC. A. (250, 125, 50, 25, 10 y 5 mg/ml) por triplicado. En un tubo se mezclaron 100 ml de la solución de extracto y 3,9 ml de 2,2-difenil-1-picrilo-hidrazila (DPPH) y se homogeneizaron en agitador, en oscuridad. En el blanco, la muestra fue reemplazada con 100 ml de metanol. Las lecturas fueron tomadas con una longitud de onda de 520 nm y se repitieron cada minuto has-

ta que se observó estabilización de la lectura. La curva estándar se determinó mediante la realización de la medición en la misma longitud de onda (520 nm), pero con las soluciones de DPPH a diferentes concentraciones (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M y 60 μ M) (Sánchez-Moreno y col. 1998; Rufino y col. 2007)

TBARS

La peroxidación de los fosfolípidos por TBARS se determinó usando el método de Ohkawa y col. (1979) con modificaciones. Una solución de yema de huevo fue mezclada con una solución de hexano-isopropanol (3:2). Esta solución se filtró y en Rotavapor se concentró hasta obtener un residuo sólido. Se tomaron 0,05 g del residuo y se adicionaron para solubilizarlo 10 ml de agua Milli-Q. Para pre-incubación de 100 μ l se utilizó fosfolípido, 50 ml de extracto a concentraciones de 100, 40, 10, 4 μ g/ml con un volumen adecuado de agua desionizada. Las muestras se repitieron mediante la adición de 14 μ l de Fe (60 μ M) y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Después de la preincubación se añadió 500 μ l de ácido acético y 500 μ l de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,6 % y se incubó durante 1 hora a una temperatura de 100 °C. A los tubos se añadieron 2 ml de n-butanol y la mezcla se centrifugó. El sobrenadante se retiró y se midió la absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro. Para la curva de MDA se utilizaron (malondialdehído) 500 μ l de ácido acético, 500 μ l de TBA (0,6 %), cantidades adecuadas de MDA para obtener concentraciones crecientes de MDA y de agua destilada para completar un volumen de 1,5 ml. El ensayo se realizó por triplicado y se repitió dos veces.

Evaluación del potencial de extracto etanólico de *Eugenia jambolana* (EEFEJ) y Extracto hidroetanólico de *Psidium myrsinites* (EHFPM) como citoprotector contra los metales pesados

Según Coutinho y col. (2008) modificado, las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de EEFEJ y EHFPM se determinaron por el ensayo de microdilución usando suspensiones de 10^5 UFC/ml en solución salina y los extractos de la concentración inicial de 1024 μ g/ml. La MIC se definió como la concentración más baja a la que no se observó crecimiento. Para evaluar el efecto protector EEFEJ y EHFPM a metales pesados, se ha realizado mediante una modulación de concentraciones subinhibitorias de los extractos, suspensiones de

105 UFC/ml de *Escherichia coli* ATCC 11105 y *Candida albicans* 62 en medio M9 Tris con 2 % de glucosa y una concentración de sulfato de hierro II que va desde 100 mM a 0,0488 mM. Las placas de microdilución se incubaron durante 48 horas a 37 °C. La concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (MFC) se determinó como la menor concentración capaz de eliminar todos los microorganismos.

Resultados y discusión

Los resultados de la *Tabla 1* muestran que la cantidad de compuestos fenólicos en los extractos de las plantas fue de 322,96 mg/g y 557,16 mg/g para EEFEJ y EHFPM, respectivamente. La cantidad de flavonoide fue mayor en el extracto de *Eugenia jambolana* Lam.

La actividad antioxidante se midió con el método de DPPH y el resultado se expresó como valor de EC_{50} siendo de 96,81 mg/ml y 7,52 mg/ml, para *Eugenia jambolana* Lam. y para *Psidium myrsinites* DC. A., respectivamente (*Tabla 2*). Cuanto menor sea el valor de EC_{50} , mayor es el poder antioxidante. Por lo tanto, la EHFPM muestra a ser más eficaz como antioxidante en relación a EEFEJ, lo cual podría estar relacionado con la alta presencia de compuestos fenólicos. Iha y col. (2008), muestra en su trabajo que la especie *Psidium guajava* L. presenta una actividad antioxidante considerable cuando se compara con las sustancias ensayadas como estándar. Cuando *P. guajava* obtiene una CE_{50} de 0,15 mg/g y comparando el resultado de este trabajo, la especie *P. guajava* tiene una mejor actividad antioxidante que *P. myrsinites*.

La CL_{50} se calculó a partir de datos obtenidos a partir de pruebas de la peroxidación lipídica (TBARS). EEFEJ mostró el mejor resultado, reduciendo la peroxidación lipídica inducida en el ensayo (*Tabla 2; Figura 1*).

Este ensayo reveló una inhibición del proceso de peroxidación lipídica con fosfolípidos de huevo. Esta reducción fue considerada más significativo para EHFPM, demostrando concentraciones de mayor importancia que las de EEFEJ (respectivamente 4 μ g/ml y 10 μ g/ml). La gran cantidad de compuestos fenólicos puede explicar el efecto antioxidante de EHFPM ya que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es por la inhibición de la peroxidación lipídica. Esta actividad es dependiente de la estructura de las moléculas, así como el número y la posición del

Tabla 1. Concentraciones totales de fenoles y los flavonoides en EEFEJ Y EHFPM

	ÁC.GÁLICO (default) (mg/g)	QUERCETINA (default) (mg/g)	EEFEJ* mg/g)	EHFPM* mg/g)
Fenoles totales	1079,06	-	322,96	557,16
Flavonoides	-	946,94	25,16	17,54

*EEFEJ - extracto etanólico de *Eugenia jambolona* Lam.; EHFPM - extracto hidroalcohólico de *Psidium myrsinites* DC. A.

Tabla 2. Valores de actividad y valores antioxidante y CL_{50} CE_{50} DE EEFEJ Y EHFPM

Muestra	CL_{50} (mg/mL) TBARS – basal	CE_{50} (mg/mL) TBARS – Fe ²⁺	DPPH
EEFEJ*	8,16	40,05	96,81
EHFPM*	178,58	86,71	7,52

EEFEJ - extracto etanólico de *Eugenia jambolona* Lam.; EHFPM - extracto hidroalcohólico de *Psidium myrsinites* DC. A.

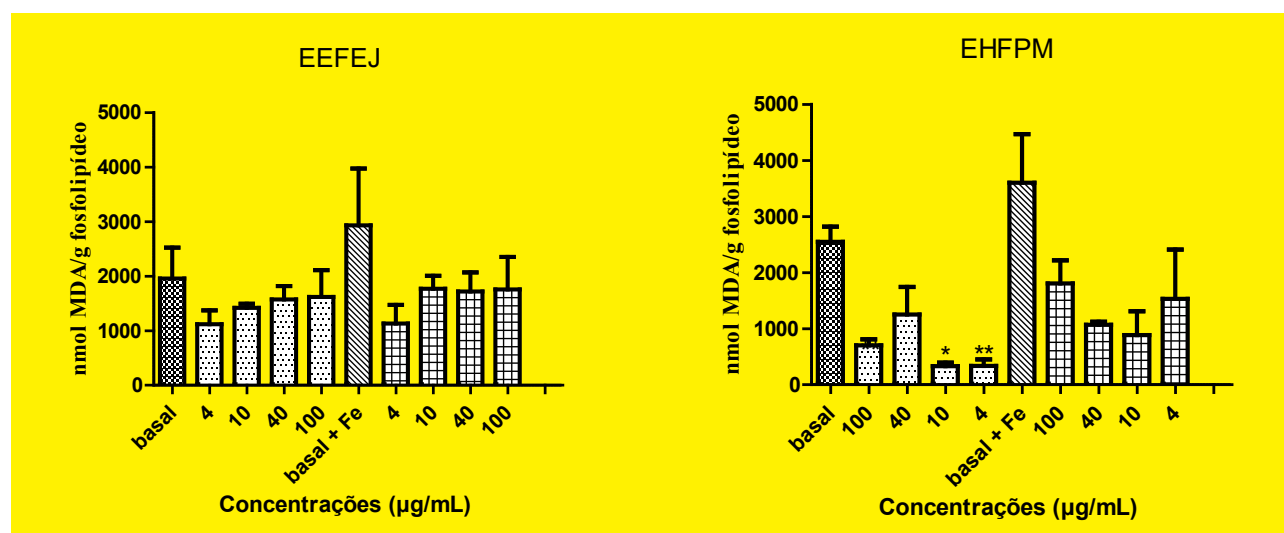


Figura 1. Propiedades antioxidantes de EEFEJ Y EHFPM. La peroxidación lipídica (TBARS producción) en fosfolípidos de huevo se determinó en ausencia o presencia de Fe²⁺ (10 mM). Los valores se expresan como media \pm SEM de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. *p < 0,05 vs Fe²⁺ inducida, **p < 0,01 vs Fe²⁺ inducida. EEFEJ - extracto etanólico de *Eugenia jambolona* Lam.; EHFPM - extracto hidroalcohólico de *Psidium myrsinites* DC. A.

grupo hidroxilo. Los compuestos fenólicos (sobre todo flavonoides) son capaces de alterar la cinética de la peroxidación mediante la alteración de la organización de los compuestos lipídicos. Ellos son estabilizados por las membranas por disminución de la fluidez evitando la difusión de los radicales libres y restringiendo la reacción de peroxidación (Michalak 2006). Un estudio realizado por Mazzanti (2003) indica que no hay efecto antiperoxidativo en el extracto de corteza de *Syzygium cumini* (*Eugenia jambolona* Lam.).

El hierro es el segundo metal más abundante, pero sin embargo tiene una baja solubilidad en entornos aeróbicos a pH fisiológico y en la célula (Crichton 1991). Por lo tanto, este elemento es por lo general el límite de disponibilidad de diferentes procesos metabólicos

celulares, que luego se retira de la atmósfera y se almacena en proteínas para evitar deficiencias que pueden conducir a la muerte celular (Brickman y Armstrong 1995).

Conclusión

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de *Eugenia jambolona* y *Psidium myrsinites*, junto con su contenido de fenoles y flavonoides. En las pruebas de la captura de radicales libres DPPH se observó una mejor actividad antioxidante en EHFPM que está relacionado con el alto contenido de compuestos fenólicos. Para probar TBARS con fosfolípido de huevo los extractos redujeron los niveles basales en el proceso de peroxidación de lípidos, y cuando fue inducido por el Fe²⁺ EHFPM fue más eficiente. El extracto

de *E. jambolana* Lam. mostró una CL_{50} con un valor más bajo. Por lo tanto, a través de estas pruebas se puede ver que los extractos de las hojas de *E. jambolana* Lam y *Psidium myrsinites* DC. A. mostraron actividad antioxidante, y podría estar relacionado con las sustancias fenólicas producidas a partir de su metabolismo secundario. Los extractos también no mostraron ningún potencial citoprotector contra el hierro II.

Bibliografía citada

Ambiente Brasil, Pesquisa da UnB descobre componente de perfume em planta do cerrado. 2009. [consultado 6 de abril 2012]. Disponible en <http://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2009/03/09/44154-pesquisa-da-unb-descobre-componente-de-perfume-em-planta-do-cerrado.html>.

Borguini R.G., Torres E.F.S. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev Int.* 2009; 25: 313-325.

Brickman T.J., Armstrong S.K., *Bortella pertussis* fur gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bortella bronchiseptica* mutants. *J Bacteriol.* 1995;177:268-270.

Coutinho H.D.M., Costa J.G.M., Lima E.O., Falcão-Silva V.S., Siqueira-Júnior J.P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy.* 2008;54:328-330.

Crichton R.R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. West Sussex: Ellis Horwood; 1991.

Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Van P.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J Agr Food Chem.* 1993;41:1242-1246.

Holetz F.B., Pessini, G.L., Sanches N.R., Cortez D.A., Nakamura C.V., Filho B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;97:1027-1031.

Iha S.M., Migliato K.F., Velloso J.C.R., Sacramento L.V.S., Pietro R.C.L.R., Isaac V.L.B., Brunetti I.L., Corrêa M.A., Salgado H.R.N. Es-

tudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:387-393.

Mazzanti C.M., Schossler D.R., Filappi A., Prestes D., Balz D., Miron V., Morsch A., Schettinger M.R.C., Morsch V.M. Cecim M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. *Ciênc Rural.* 2003;33:1061-1065.

Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud.* 2006; 15:523-530.

Ohkawa H., Ohishi H., Yagi K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 1979;95:351-358.

Reid A.B., Kurten R.C., McCullough S.S., Brock R.W., Hinson J.A. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Ther Exp.* 2006;312:509-516.

Rufino M., Alves R., Brito E., Morais S., Sampaio C., Jimezes-Perez J., Saura-Calixto F. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2007.

Sanchez-Moreno J.A., Larrauri F., Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agr.* 1998;76:270-276.

Silva C.G., Herdeiro R.S., Mathias C.J., Panek A.D., Silveira C.S., Rodrigues V.P., Renó M.N., Falcão D.Q., Cerqueira D.M., Minto A.B.M., Nogueira F.L.P., Quaresma C.H., Silva J.F.M., Menezes F.S., Eleutherio E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Res.* 2005;52:229-233.

Sousa C.M.M., Silva H.S., Vieira-Jr. G.M., Ayres M.C.C., Costa C.L.S., Araújo D.S., Cavalcante L.C.D., Barros E.D.S., Araújo P.B.M., Brandão M.S., Chaves M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova.* 2007;30:351-355.

Sun J., Shao-Fang L., Chu-Shu Z., Li-Na Y., Jie B., Feng Z., Qing-Liy. Chemical composition and antioxidant activities of *Brussonetia papyfera* fruits. *Plos One*. 2012;7:1-8.

Thérond P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraul A., Conti M., Legrand A. Biomarkers of

oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000;3:373-384.

Vieira R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: *Perspective in new crops and new uses*. Janick J. (ed). Alexandria: AHS press; 1999.

Avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos (Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas
Evaluation of water quality of the Sinos River (Brazil) by micronucleus test in *Cyprinus carpio* and physicochemical and microbiological analysis

Santos de Souza Mateus^{1*}, Zimmermann Prado Rodrigues Gabriela¹, Dalzochio Thais¹, Goldoni Angélica², Ressel Simões Leonardo Airton¹, Gehlen Günther¹, Basso da Silva Luciano²

¹Universidade Feevale. Campus 2. Instituto de Ciências da Saúde. Laboratório de Histologia Comparada. Endereço: Rodovia RS-239, km 2755, CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brasil. ²Universidade Feevale. Campus 2. Instituto de Ciências da Saúde. Laboratório de Citogenética Animal. Endereço: Rodovia RS-239, km 2755, CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

*mateussouza@feevale.br

Recibido: 9 de noviembre de 2015

Aceptado: 9 de septiembre de 2016

Resumo. O Rio dos Sinos está localizado na região sul do Brasil, possui aproximadamente 190 km de extensão e fornece água para atividades agrícolas, industriais e para o consumo de mais de um milhão de habitantes. Este rio é considerado um dos mais poluídos do Brasil e, portanto, estudos para avaliar a qualidade da água ao longo de sua extensão são necessários. O teste de micronúcleos em eritrócitos de peixes tem sido utilizado com sucesso para detectar a presença de poluentes mutagênicos nos ambientes aquáticos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade da água do Rio dos Sinos por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* bem como de análises físico-químicas e microbiológicas. Foram coletadas amostras de água nos trechos superior (Caraá), médio (Parobé) e inferior (Novo Hamburgo) do Rio dos Sinos em dezembro de 2013. As amostras foram transportadas para o laboratório para análise de 14 parâmetros de qualidade da água bem como para a exposição de espécimes de *C. carpio* por 72h em aquários. Não foram verificadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares nos grupos expostos a água do rio em comparação ao grupo controle. Apenas um parâmetro de qualidade da água foi observado em desacordo com a legislação no trecho superior do rio, enquanto que nos trechos médio e inferior foram seis e cinco parâmetros, respectivamente. Os resultados demonstram que o Rio dos Sinos apresenta redução da qualidade da água ao longo de sua extensão e indicam ausência de potencial genotóxico no período amostrado.

Palavras-chave: Rio dos Sinos; Biomarcadores; Qualidade da água; *Cyprinus carpio*

Abstract. The Sinos River is located in South of Brazil, it has about 190 km of extension and provides water for agricultural and industrial activities, and for consumption of more than one million inhabitants. This river is considered one of the most polluted rivers in Brazil; therefore, studies aiming to evaluate the water quality along its course are necessary. The micronucleus test in fish erythrocytes has been successful used to detect mutagenic pollutants in the aquatic environment. The objective of this study was to evaluate the water quality of the Sinos River by the micronucleus test in *Cyprinus carpio*, as well as physicochemical and microbiological analyses. Water samples were collected in the upper (Caraá municipality), middle (Parobé municipality) and lower (Novo Hamburgo municipality) sections of the Sinos River, in December 2013. The samples were transported to the laboratory for analysis of 14 water quality parameters and for exposure of *C. carpio* for 72 hours in aquaria. Significant differences in micronucleus and nuclear abnormalities frequencies were not found between the control and the exposed groups. Only one parameter of water quality exceeded the limit of the legislation in the upper section of the river, while in the middle and lower sections, six and five parameters, respectively. These results show that the Sinos River presents a reduction in water quality along its extension and indicates the absence of genotoxic potential in the sampled period.

Keywords: Sinos river; Biomarkers; Water quality; *Cyprinus carpio*

Introdução

O Rio dos Sinos, localizado na região nordeste do Rio Grande do Sul, é considerado um dos principais rios do estado, concentrando na área de sua bacia hidrográfica significativa percentagem da população, além de um gran-

de parque industrial e turístico (Comitesinos 2000). Ao longo de sua extensão, de aproximadamente 190 km, fornece água para atividades agrícolas, industriais e para consumo humano, sendo também utilizado como meio

de diluição de efluentes de esgoto doméstico, efluentes industriais e dejetos de origem rural (Bieger *et al.* 2010).

Os impactos provocados pelas atividades antrópicas contribuem para a redução da qualidade da água do Rio dos Sinos. Monitoramentos de parâmetros físico-químicos da água realizados ao longo do rio indicam que essa redução ocorre principalmente no seu trecho inferior, próximo a grandes centros urbanos, nos quais há maior densidade populacional e industrial (Blume *et al.* 2010). De acordo com o órgão estadual de meio ambiente (SEMA 2014), diversos pontos ao longo do rio foram avaliados nas classes III e IV de qualidade de água conforme classificação estabelecida pela resolução brasileira CONAMA 357/2005 (Brasil 2005), na qual a classe I representa a melhor qualidade e a classe IV a pior.

Além do monitoramento de parâmetros físico-químicos, diversos estudos propondo a utilização de bioindicadores como ferramentas complementares na avaliação da qualidade das águas do rio têm sido realizados (Schulz e Martins-Júnior 2001; Rechenmacher *et al.* 2010; Scalon *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2011; Scalon *et al.* 2013; Weber *et al.* 2013; Bergamaschi *et al.* 2015; Bianchi *et al.* 2015). Tais estudos são importantes para que a análise dos impactos provocados pelas atividades antrópicas seja mais ampla, visto que proporcionam a possibilidade de revelar o potencial tóxico da água aos organismos vivos. Peixes são bastante utilizados como bioindicadores de ambientes aquáticos, tanto em estudos *in situ*, devido a sua grande disponibilidade e importante papel na cadeia trófica (Oost *et al.* 2003), como em laboratório, devido à facilidade de manutenção e exposição (Al-Sabti e Metcalfe 1995).

O teste de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes é uma ferramenta muito utilizada para análise da genotoxicidade da água devido a sua simplicidade e rapidez de análise (Bolognesi e Hayashi 2011). Os micronúcleos são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros não inseridos no núcleo celular durante o processo de divisão (Al-Sabti e Metcalfe 1995). As anormalidades nucleares são deformações na morfologia do núcleo, as quais também são consideradas indicadoras de efeitos genotóxicos (Çavas e Ergene-Gözükara 2005).

A espécie *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) da família Cyprinidae, conhecida popular-

mente como carpa comum, é muito utilizada em pisciculturas no Brasil. É originária da Europa Oriental e da Ásia Ocidental e foi uma das primeiras espécies a serem cultivadas em aquicultura. Atualmente seu cultivo ocorre em todos os continentes devido a sua rusticidade e facilidade de criação (Querol *et al.* 2005). A espécie já foi utilizada com sucesso em estudos de avaliação de genotoxicidade (Buschini *et al.* 2004; Gustavino *et al.* 2005; Canistro *et al.* 2012; García-Medina *et al.* 2013). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade da água do Rio dos Sinos por meio do teste de micronúcleos em *C. carpio* bem como de análises físico-químicas e microbiológicas.

Material e métodos

Área de estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos está localizada a nordeste do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas de 29° 20' a 30° 10' de latitude Sul e 50° 15' a 51° 20' de longitude Oeste. Possui área de aproximadamente 3.800 km², abrangendo, parcial ou totalmente, 32 municípios e uma população estimada em 1.249.000 habitantes (SEMA 2010). O principal curso de água da bacia e que dá nome a mesma é dividido em três trechos: superior, com 25 km de extensão, caracterizado por alta declividade do fundo e rápido fluxo das águas; médio, que se estende por 125 km e cuja altitude varia de 60 m a 5 m em declividade média; inferior, com aproximadamente 50 km de extensão, no qual a declividade é suave e o fluxo das águas é lento (Comitesinos 2000).

O trecho superior apresenta baixa densidade populacional e atividades econômicas predominantemente rurais. No trecho médio e principalmente no trecho inferior há grandes concentrações populacionais e industriais, sendo que afluentes do Rio dos Sinos drenam grandes centros urbanos como Novo Hamburgo e São Leopoldo. O trecho inferior da bacia é o que está exposto a maior pressão antrópica e nele está instalada a maior base industrial do estado do Rio Grande do Sul (Figueiredo *et al.* 2010).

Coleta de águas superficiais

No mês de dezembro de 2013 foram realizadas as coletas de amostras de águas superficiais em três pontos do Rio dos Sinos, localizados nos municípios de Caraá (29° 45' 44.4"

S / 50° 19' 39.8" W), Parobé (29° 41' 10.7" S / 50° 51' 03.4" W) e Novo Hamburgo (29° 44' 12.5" S / 51° 05' 29.1" W), representando os três trechos do rio, superior, médio e inferior, respectivamente (Figura 1). As amostras foram conduzidas ao laboratório, sendo os seguintes parâmetros analisados de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 1998): demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), fósforo total, nitrogênio amoniacal, sólidos suspensos, coliformes totais e termotolerantes, alumínio, chumbo, cobre, cromo total, ferro, níquel e zinco.

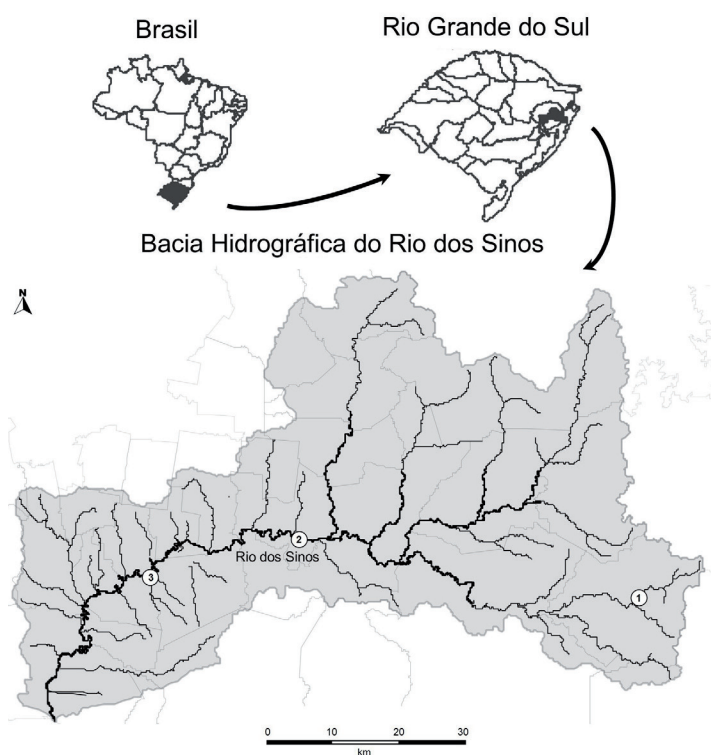


Figura 1. Localização da área de estudo. Pontos de coleta de água no Rio dos Sinos indicados por números: 1) Caraá, 2) Parobé, 3) Novo Hamburgo.

Procedimento experimental

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Feevale (protocolo n.02.13022). Espécimes de *C. carpio* (n=40) foram adquiridos de um piscicultor local e aclimatados por sete dias em água da torneira declorificada com aeração constante, em sala com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo natural. Após a aclimação, os

peixes foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=10): Caraá, Parobé, Novo Hamburgo, os quais foram expostos à água proveniente do respectivo ponto de amostragem no rio, e um grupo controle mantido em água da torneira declorificada.

Após 72 horas de exposição, os animais foram sacrificados por secção da medula espinhal e através de um corte na região do pedúnculo caudal foi coletado sangue para a realização da técnica do esfregaço em lâmina citológica. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e coradas em Giemsa 5% por 10 minutos, sendo então lavadas em água corrente, codificadas e analisadas em microscópio óptico em aumento de 1000x. Foram analisados 2000 eritrócitos por animal. Partículas pequenas, arredondadas ou ovais, não refrativas e com o mesmo padrão de coloração do núcleo principal foram consideradas micronúcleos (Çavas e Ergene-Gözükara 2005). Alterações na morfologia do núcleo, tais como brotamentos, invaginações e segmentações foram consideradas anormalidades nucleares (Carrasco *et al.* 1990; Pacheco e Santos 1997).

As frequências de micronúcleos e anormalidades nucleares foram comparadas entre os grupos expostos à água do rio e o grupo controle. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$). O programa utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 22.0.

Resultados

Os resultados obtidos na análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água coletadas são exibidos na *tabela 1*. Não foram detectadas concentrações de nitrogênio amoniacal, cobre e cromo total em nenhum dos pontos. Todas as amostras apresentaram valores de DBO acima do limite permitido para águas de classe I ($3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) conforme a resolução CONAMA 357/2005. Para os demais parâmetros analisados, Caraá apresentou todos os resultados dentro do limite para a classe I, enquanto Parobé e Novo Hamburgo ficaram acima do limite para fósforo total, coliformes termotolerantes, alumínio e ferro, sendo os maiores valores registrados para Novo Hamburgo. O ponto de Parobé foi o único em que foi detectado o metal chumbo e em concentração acima do limite para águas de classe I.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água do Rio dos Sinos coletadas nas cidades de Caraá, Parobé e Novo Hamburgo, correspondendo aos trechos superior, médio e inferior do rio, respectivamente.

Parâmetros	Caraá	Parobé	Novo Hamburgo	Legislação*
DBO (mg O ₂ L ⁻¹)	7**	5**	<5**	3
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	20,2	24,9	12,9	-
Fósforo total (mg L ⁻¹)	0,1	0,14**	0,19**	0,1
Sólidos suspensos (mg L ⁻¹)	5,5	12	16,5	-
Coliformes termotolerantes (NMP/100 mL)	100	1700**	11000**	200
Coliformes totais (NMP/100 mL)	6800	8100	37000	-
Alumínio (mg L ⁻¹)	n.d.	0,758**	1,165**	0,100
Chumbo (mg L ⁻¹)	n.d.	0,021**	n.d.	0,010
Ferro (mg L ⁻¹)	0,118	0,637**	1,645**	0,300
Níquel (mg L ⁻¹)	0,007	0,011	0,009	0,025
Zinco (mg L ⁻¹)	0,013	0,010	0,023	0,180

*Valores máximos permitidos pela legislação brasileira para águas de classe I (Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA).

**Valores acima do permitido para a classe I.

Para o teste de micronúcleos (*Tabela 2*), não foram verificadas diferenças significativas nas comparações das frequências de micronúcleos e de anormalidades nucleares dos grupos expostos à água do rio em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Frequências de micronúcleos (MN) e de anormalidades nucleares (AN) em espécimes de *Cyprinus carpio* expostos à água do Rio dos Sinos.

	MN/1000	AN/1000
Controle	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,35
Caraá	0,10 ± 0,32	0,95 ± 1,30
Parobé	0,00 ± 0,00	0,55 ± 0,50
Novo Hamburgo	0,10 ± 0,32	0,50 ± 0,53
p (Kruskal-Wallis)	0,56	0,29

Discussão

O trecho superior do rio apresentou, em geral, parâmetros físico-químicos e microbiológicos dentro dos limites permitidos para águas de classe I conforme a resolução brasileira CONAMA 357/2005. Segundo o Comitês Sinos (2000), essa região apresenta os menores impactos ambientais da bacia hidrográfica. Os

trechos médio e especialmente inferior, por outro lado, estão expostos a maiores pressões antrópicas (Blume *et al.* 2010), de forma que a maior quantidade de parâmetros acima dos limites de concentração para a classe de melhor qualidade de água nessas regiões é reflexo dessa situação.

Diversos estudos já foram realizados na Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos visando à avaliação do potencial genotóxico de suas águas. Scalón *et al.* (2013) revisaram o resultado de alguns desses estudos, os quais aplicaram diferentes metodologias, como o teste *Salmonella*/ Microssoma, teste de micronúcleos em linhagem celular, teste *Allium cepa*, entre outros, constatando que houve tanto resultados positivos quanto negativos para efeitos genotóxicos.

Scalón *et al.* (2010) propuseram o primeiro experimento utilizando biomarcadores de genotoxicidade em peixes para avaliar a água do Rio dos Sinos, o teste de cometa em eritrócitos de *Hyphessobrycon luetkenii*. Os autores verificaram alterações sazonais na frequência de danos de DNA induzida pela água dos trechos superior e inferior. Scalón *et al.* (2013), também utilizando teste de cometa em *H. luetkenii*, verificaram efeito genotóxico na água do trecho

médio na coleta de verão e nos três trechos na coleta de inverno quando comparados ao grupo controle. Bergamaschi *et al.* (2015) aplicaram o teste de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes da espécie *Leporinus obtusidens* expostos à água coletada nos três trechos do rio, não encontrando diferenças significativas entre esses grupos e o controle. Bianchi *et al.* (2015) aplicaram tanto o teste de micronúcleos e anormalidades nucleares quanto o ensaio cometa em eritrócitos de *Astyanax jacuhiensis* expostos à água do Rio dos Sinos. Para a primeira metodologia, não encontraram diferenças entre os trechos analisados, mas para a segunda, verificaram aumento na frequência de danos ao material genético dos grupos expostos à água dos trechos médio e inferior em comparação ao trecho superior.

O teste de micronúcleos em eritrócitos de *C. carpio* já foi utilizado com o objetivo de verificar o potencial genotóxico de determinadas substâncias (Buschini *et al.* 2004; Gustavino *et al.* 2005; Canistro *et al.* 2012; García-Medina *et al.* 2013) ou a sensibilidade da espécie às mesmas (Al-Sabti 1986; Grisolia e Cordeiro 2000). São poucos os estudos visando à avaliação de corpos de água com a espécie. Grisolia e Starling (2001) e Grisolia *et al.* (2009) realizaram o teste em espécimes capturados no lago Paranoá, Brasília.

A ausência de diferença nas frequências de micronúcleos e de anormalidades nucleares entre o grupo controle e os grupos expostos à água do rio indica a ausência de potencial genotóxico da água do Rio dos Sinos em *C. carpio* no período amostrado. As baixas frequências de micronúcleos nos animais do presente estudo e também reportadas na literatura para a espécie (Grisolia e Starling 2001; Grisolia *et al.* 2009), podem ser consideradas a taxa basal para a espécie e é similar a observada para a maioria das espécies de peixes, cujas médias variam entre 0 e 1 micronúcleos por 1.000 células (Bolognesi e Hayashi 2011). Este estudo foi o primeiro a aplicar o teste de micronúcleos em *C. carpio* para avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos, e, para que esta espécie seja utilizada como bioindicadora, algumas variações nas condições experimentais devem ser testadas, tais como maiores períodos de exposição, e também a análise de maior número de células, tal como sugere Udrouiu (2006) para espécies nas quais as frequências de micronúcleos são baixas.

Agradecimentos. Os autores agradecem à Universidade Feeva-

le, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de bolsas.

Referências

Al-Sabti K. Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. Comp Biochem Physiol. 1986;85C(1):5-9.

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

American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington, DC. American Public Health Association, 1998.

Bergamaschi B., Rodrigues M.T., Silva J.V.S., Kluge M., Luz R.B., Fleck J.D., Bianchi E., Silva L.B., Spilki F.R. Moving beyond classical markers of water quality: detection of enteric viruses and genotoxicity in water of the Sinos River. Braz J Biol. 2015;75(2):S63-S67.

Bianchi E., Goldoni A., Trintinaglia L., Lessing G., Silva C.E.M., Nascimento C.A., Ziulkoski A.L., Spilki F.R., Silva L.B. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. Braz J Biol. 2015;75(2):S68-S74.

Bieger L., Carvalho A.B.P., Strieder M.N., Maltchik L., Stenert C. Are the streams of the Sinos River basin of good water quality? Aquatic macroinvertebrates may answer the question. Braz J Biol. 2010;70(4):1207-1215.

Blume K.K., Macedo J.C., Meneguzzi A., Silva L.B., Quevedo D.M., Rodrigues M.A.S. Water quality assessment of the Sinos River, Southern Brazil. Braz J Biol. 2010;70(4):1185-1193.

Bolognesi C., Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. Mutagenesis. 2011;26(1):205-213.

Buschini A., Martino A., Gustavino B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi C., Santoro M., Dörr A.J.M., Rizzoni M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. Mutat Res. 2004;557:119-129.

Canistro D., Melega S., Ranieri D., Sapone A.,-Gustavino B., Monfrinotti M., Rizzoni M., Paolini M. Modulation of cytochrome P450 and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to surface water treated with chlorine or alternative disinfectants in different seasons. *Mutat Res.* 2012;729:81-89.

Carrasco K.R., Tilbury K.L., Mayers M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Can J Fish Aquat Sci.* 1990;47:2123-2136.

Çavas T., Ergene G. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology.* 2005;74:264-271.

Comitesinos. Enquadramento das águas da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos. São Leopoldo: Impresul, 2000.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Brasil. Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 2005;53:58-63.

Figueiredo J.A.S., Drumm E., Rodrigues M.A.S., Spilki F.R. 2010. The Rio dos Sinos watershed: an economic and social space and its interface with environmental status. *Braz J Biol.* 2010;70(4):1131-1136.

García-Medina S., Núñez-Betancourt J.A., García-Medina A.L., Galar-Martínez M., Neracruz N., Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;96:191-197.

Grisolia K, Cordeiro CMT. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet Mol Biol.* 2000;23(1):235-239.

Grisolia C.K., Starling F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under

influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat Res.* 2001;491:39-44.

Grisolia C.K, Rivero C.L.G, Starling F.L.R.M., Silva I.C.R., Barbosa A.C., Dorea J.G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet Mol Biol.* 2009;32(1):138-143.

Gustavino B., Buschini A., Monfrinotti M., Rizzoni M., Tancioni L., Poli P., Rossi C. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. *Mutat Res.* 2005;587:103-113.

Nunes E.A., Lemos C.T., Gavronski L., Moreira T.N., Oliveira N.C.D., Silva J. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. *Chemosphere.* 2011;84:47-53.

Oost R.V.D., Beyer J., Vermeulen N.P.E. Fish Bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003;13:57-149.

Pacheco M., Santos M A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol Environ Saf.* 1997;38:252-259.

Querol M.V.M., Querol .E, Pessano E.F.C., Azevedo C.L.O. Ocorrência da carpa húngara, *Cyprinus carpio* (LINNAEUS, 1758) e disseminação parasitária, no Arroio Felizardo, bacia do médio Rio Uruguai, Uruguaiana, RS, Brasil. *Biodiv Pamp.* 2005;3:21-23

Rechenmacher C., Siebel A.M., Goldoni A., Klauck C.R., Sartori T., Rodrigues T., Rodrigues M.A.S., Gehlen G., Ardenghi P.G., Silva L.B. A multibiomarker approach in rats to assess the impact of pollution on Sinos River, Southern Brazil. *Braz J Biol.* 2010;70(4):1223-1230.

Schulz U.H., Martins-Junior H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Braz J Biol.* 2001;61(4):615-622.

Scalon M.C.S., Rechenmacher C., Siebel A.M., Kayser M.L., Rodrigues M.T., Maluf S.W., Rodrigues M.A.S., Silva L.B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz J Biol.* 2010;70(4):1217-1222.

Scalon M.C.S., Rechenmacher C., Siebel A.M., Kayser M.L., Rodrigues M.T., Maluf S.W., Rodrigues M.A.S., Silva L.B. Genotoxic potential and physicochemical parameters of Sinos River, southern Brazil. *Sci World J.* 2013;2013:209737.

Secretaria Estadual de Meio Ambiente (SEMA). [em-linea]. Porto Alegre: Estado do Rio Grande do Sul. [Atualizado em 8 de setembro de 2010; consulta 1 de abril de 2015]. Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/>.

Secretaria Estadual de Meio Ambiente (SEMA). [em-linea]. Porto Alegre: Estado do Rio Grande do Sul. [Atualizado em 16 de outubro

de 2014; consulta 1 de junho de 2015]. Relatório Executivo do Plano da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos – REP Fase C: Plano de Bacia. Disponível em: http://www.sema.rs.gov.br/upload/Relatorio_Executivo.pdf.

Udroiu I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology.* 2006;79: 201-204.

Weber P., Behr E.R., Knorr C.D.L., Vendruscolo D.S., Flores E.M.M., Dressler V.L., Baldiserotto B. Metals in the water, sediment and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchem J.* 2013;106:61–66.

RESÚMENES DE TESIS

Estudio de factores que regulan la biotransformación del arsénico en poblaciones expuestas crónicamente

Olmos, Valentina

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Toxicología y Química Legal. Junín 956, 7°, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1113AAD)

volmos@ffyb.uba.ar

La Argentina es uno de los países que se encuentra afectado por la presencia de altas concentraciones de arsénico (As) en sus recursos de agua subterránea. En muchas zonas del país, estas aguas constituyen la única fuente para el consumo humano. Los habitantes de dichas zonas se encuentran expuestos en forma crónica al As a través del agua de bebida y pueden desarrollar hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE) e incluso derivar en cáncer. Sin embargo, es un hecho que no todas las personas expuestas al As desarrollan HACRE, ni todos los casos de HACRE derivan en cáncer.

Se piensa que la capacidad individual para biotransformar el As tiene un rol importante en la predisposición a desarrollar la enfermedad, así como en la aparición de los cánceres relacionados.

Los seres humanos muestran ciertas características para biotransformar el As que los diferencian de las otras especies de mamíferos (metabolismo metilante, eliminación de metabolitos monometilados). Asimismo, existe una gran variabilidad en la capacidad para metilar el As entre individuos. Esta variabilidad se ha asociado a diversos factores, tales como el género, la edad, el nivel de exposición, la etnia, el estado nutricional, la presencia de polimorfismo en genes codificantes de enzimas relacionadas con el metabolismo del As, entre otros. La influencia de estos factores, a su vez, se estudia en relación al desarrollo de diversos cánceres. El objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de factores como el género, la edad y la presencia de polimorfismo genético, sobre el metabolismo del As en población humana con diferentes niveles de exposición al As.

Se incluyeron 234 individuos residentes de zonas de HACRE, con exposición confirmada al As. Se estudió la influencia del género, la edad y la condición de adulto o niño, la presencia de polimorfismo genético (en los ge-

nes *As³MT* y *MTHFR* codificantes de las enzimas arsenito metiltransferasa (*As³MT*) y la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*, respectivamente), y el nivel de exposición, sobre la capacidad de los individuos para metilar al As. El perfil metabólico urinario del As (conformado por el AsI ($As^{III} + As^V$), el ácido monometilarsónico (MMA) y el ácido dimetilarsínico (DMA)) se utilizó como indicador de la capacidad metilante. Se investigó la influencia de cada factor en forma individual y también de todos los factores en forma conjunta. Ambos análisis se llevaron a cabo en la población total y en grupos poblacionales segmentados por nivel de exposición.

Los resultados mostraron al género, a la condición de adulto o niño, a la presencia de polimorfismo en el gen *As³MT* y al nivel de exposición como factores influyentes en el perfil metabólico urinario del As. El género femenino, la condición de niño y el portar el genotipo silvestre en el gen *As³MT* fueron condiciones que aportaron a un perfil metabólico urinario favorable (mayor porcentaje de DMA urinario a expensas de menor porcentaje de MMA). También se comprobó que el nivel de exposición puede condicionar la influencia de los otros factores. La influencia favorable del genotipo silvestre sobre el perfil metabólico urinario del As se manifestó, principalmente, a niveles de exposición entre bajos y moderados (As urinario hasta 500 $\mu\text{g/g}$ de creatinina). A medida que aumentó el nivel de exposición, la diferencia en el perfil de metabolitos urinarios entre portadores y no portadores del polimorfismo desapareció. Con el género femenino y la condición de niño ocurrió lo opuesto: las diferencias en el perfil metabólico urinario entre mujeres y varones o entre niños y adultos no se evidenciaron sino hasta que el nivel de exposición fue elevado (As urinario mayor a 500 $\mu\text{g/g}$ de creatinina). Por otro lado, la edad (como variable continua) y la presencia de polimorfismo en el gen *MTHFR* no

mostraron influencia sobre el perfil metabólico urinario.

Los resultados encontrados en relación al género y a la condición de niño o adulto podrían explicarse teniendo en cuenta ciertas características diferenciales entre géneros o entre niños y adultos, relacionadas con el estatus metilante.

El estatus metilante está representado por los niveles de S-adenosil metionina (SAM), S-adenosil homocisteína (SAH) y de folato. La SAH es una potente inhibidora de varias metiltransferasas y su aumento podría estar relacionado con una menor actividad de la As³MT. Los niveles de SAH se relacionan directamente con los de homocisteína (HCis) y está descripto que las mujeres y los niños tienen menores niveles de HCis que los varones y los adultos, respectivamente, razón por la cual los primeros podrían expresar una mayor actividad de As³MT que los segundos.

Otra explicación que puede sumarse a la anterior está relacionada con la actividad de la

As³MT y su afinidad por cada sustrato. Al ser la misma enzima la encargada de los dos pasos de metilación del As, es esperable una competencia entre sus dos sustratos. Varios estudios demostraron la distinta afinidad de la As³MT por sus dos sustratos (AsI y MMA), hecho que contribuye a explicar la influencia del nivel de exposición en el perfil de metabolitos metilados.

De todos los factores estudiados, el único que puede ser efectivamente controlado, en un contexto de manejo de riesgo, es el nivel de exposición. Es decir que no solo debe disminuirse el nivel de exposición de la población, porque a menores exposiciones habrá menores daños, sino también porque ciertos subgrupos poblacionales verán afectada su capacidad de metabolizar favorablemente el As frente a exposiciones elevadas.

Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica

Directora de tesis: Prof. Dra. Edda C. Villaamil Lepori

Financiamiento: Proyecto UBACyT 20020100100394

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 interesantes 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 Infor-

mación 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.

Gratuidad de las publicaciones

El envío, revisión, edición y publicación de cualquier tipo de material técnico científico o de divulgación aceptado por Acta Toxicológica Argentina es totalmente gratuito para los autores, no debiendo estos abonar ningún tipo de costo para su publicación ni para ninguna de las etapas previas.

Derechos de autor

Acta Toxicológica Argentina es una publicación de acceso abierto y posee una Licencia Pública de Creative Commons (CC-BY-NC). Los autores conservan los derechos de autor y garantizan a la revista el derecho de ser la primera publicación del trabajo. Los autores retienen el derecho sobre sus trabajos bajo las normas de la licencia CC de tipo BY-NC, HYPERLINK "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licencia Pública de Creative Commons que permite compartir el trabajo reconociendo su publicación inicial en esta revista, pudiendo los autores disponer del trabajo para el fin que consideren, con la sola excepción de su reproducción con fines comerciales, de acuerdo a este tipo de licencia de CC.

Derechos de publicación

Los autores retienen los derechos de publicación. Acta Toxicológica Argentina es una publicación de acceso abierto y posee una Licencia Pública de Creative Commons (CC-BY-NC). Los autores conservan los derechos de publicación y garantizan a la revista el derecho de ser el primer sitio de publicación del trabajo. Los autores retienen el derecho para publicar sus trabajos bajo las normas de la licencia CC de tipo BY-NC, HYPERLINK "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licencia Pública de Creative Commons que permite compartir el trabajo reconociendo su publicación inicial en esta revista, pudiendo los autores disponer del trabajo para el fin que consideren, con la sola excepción de su reproducción con fines comerciales, de acuerdo a este tipo de licencia de CC.

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

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

Todos los valores de parámetros hematológicos y bioquímicos se presentarán en unidades del sistema métrico decimal, de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). No obstante, los editores podrán solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores añadan unidades alternativas o distintas de las del SI.

Nomenclatura. En el caso de sustancias químicas se tomará como referencia prioritaria a las normas de la IUPAC. Los organismos se denominarán conforme a las normas internacionales, indicando sin abreviaturas el género y la especie en itálica.

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

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

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

Ejemplos:

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

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

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

Ejemplos:

1. **Artículo estándar en publicación periódica**

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

2. **Libros y monografías**

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

3. **Capítulo de libro**

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

4. **Material electrónico**

a. Artículo en publicación periódica en internet

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

org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle

B. Página en internet

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

c. Parte de una página de internet

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

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

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

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

The goal of *Acta Toxicológica Argentina* is to publish articles concerning all areas of Toxicology, including original articles, case reports, short communications, revisions, popularization of science articles, technical notes, 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 eco-toxicological 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 exceptional, 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>

Free publishing costs

The submission, reviewing, editing and publishing of any kind of scientific or technical material or of any disclosure material accepted by *Acta Toxicológica Argentina* is totally free for authors, not having to pay any cost for its publication or for any of the previous stages.

Copyright

Acta Toxicológica Argentina is an open access journal and has a Creative Commons Public License (CC-BY-NC). Authors retain copyright on their work; nevertheless, they guarantee the journal the right to be the first in its publication. Authors retain the rights of their work under the guidelines of the license CC BY-NC, Creative Commons Public License. They can freely share their work (always recognizing its initial publication in this journal) with the sole exception of its reproduction for commercial purposes, according to this kind of CC license.

Publishing rights

Acta Toxicológica Argentina is an open access journal and has a Creative Commons Public License (CC-BY-NC). Authors retain the license of their article and the publication rights on their work; nevertheless, they guarantee the journal the right to be the first in its publication. Authors retain the license and rights to their work under the guidelines of the license CC BY-NC, Creative Commons Public License. They can freely share their work (recognizing its initial publication in this journal) with the sole exception of reproduction of the work published for commercial purposes, according to this kind of CC license.

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 paragraph, using Arial 10 lettering.

References. Citations in the text consist of the authors' last name (up to two authors) and the year of publication in parentheses. In the case of more than one citation, list them from the oldest to the newest and separate citations by semicolons. For more than two authors, only cite the first author's last name followed by *et al.* and the year of publication.

Examples:

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

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

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

Examples:

1. **Standard article in periodical publications**

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-7.

2. **Books and monographs**

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

3. **Book chapters**

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

4. **Electronic material**

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

B. Website

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

c. Partial website

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

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

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As imagens não devem ser excepcionais, mas sim ilustrativas.

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

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

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

Não deve haver mais de três (3) autores.

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

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

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

Envio de trabalhos

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

Custos de publicação gratuitos

O envio, revisão, edição e publicação de qualquer tipo de material de divulgação científica ou técnica aceita pela Acta Toxicológica Argentina é livre para os autores, não ter que pagar qualquer custo para publicação ou qualquer das fases anteriores.

Direitos autorais

Acta Toxicológica Argentina é uma open access publicação com uma Licença Pública Creative Commons (CC-BY-NC). Autores mantêm seus direitos autorais e garantir a o revista o direito de ser a primeira em publicação da obra. Autores mantêm os direitos a seu trabalho sob as regras da licença CC BY-NC, Licença Pública Creative Commons para a partilha de trabalho, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista. Os autores são livres para usar a obra para qualquer fim, menos comercial, de acordo com este tipo de licença CC.

Os direitos de publicação

Acta Toxicológica Argentina é uma open access publicação com uma Licença Pública Creative Commons (CC-BY-NC). Autores mantêm seus direitos de publicação e licença e garantir a o revista o direito de ser a primeira em publicação da obra. Autores mantêm os direitos a seu trabalho sob as regras da licença CC BY-NC, Licença Pública Creative Commons para a partilha de trabalho, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista. Os autores são livres para usar a obra para qualquer fim, menos comercial, de acordo com este tipo de licença CC.

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original

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

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho, nomes e sobrenomes completos de todos os autores; lugar de trabalho (nome da instituição e endereço postal), se houver autores com distintos lugares de trabalho, deverão ser colocados superíndices numéricos, não entre parênteses, junto aos nomes, para identificar cada autor com seu respectivo lugar

de trabalho; fax e/ou correio eletrônico do autor responsável correspondente (que será indicado com um asterisco na posição de super-índice localizado junto ao nome).

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

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

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

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

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

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

As **tabelas** deverão ser apresentadas em folha à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos, com as aclarações correspondentes. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando números arábicos entre parênteses e super-índice. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

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

As **fotografias** deverão ser feitas 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

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