

# *Acta Toxicológica Argentina*

---

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 26  
N° 1  
Mayo 2018

Acta Toxicologica Argentina es el organo oficial de difusion cientifica de la Asociacion Toxicologica Argentina. Tiene por objetivo la publicacion de trabajos relacionados con las diferentes areas de la Toxicologia, en formato de articulos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, articulos de divulgacion, notas tecnicas, resúmenes de tesis, imagenes, cartas al editor y noticias.

Acta Toxicologica Argentina integra el Nucleo Basico de Revistas Cientificas Argentinas y se puede acceder a sus articulos a texto completo a traves del Portal de Revistas Cientificas y Tecnicas argentinas (PPCT) y a traves 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

Mirtha M. Nassetta

##### Vicepresidente

Ricardo A. Fernández

##### Tesorera

Mirta Ryczel

##### Secretaria

Julietta S. Borello

##### Vocales

Fernanda Simoniello

Jorge Zavatti

Patricia Lucero

##### Vocales suplentes

Ana Irene Cañas

Augusto Piazza

Noemí Reartes

##### Comité científico

Aldo Sergio Saracco

Silvia Cristina Cortese

María Graciela Bovi Mitre

Gerardo Daniel Castro

Adriana Silvia Ridolfi

##### Órgano de fiscalización

Daniel González

Patricia Quiroga

Adriana Piñeiro

##### Tribunal de honor

José A. Castro

Edda C. Villaamil Lepori

Elda Cargnel

#### 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, Univ Católica de Córdoba*

Susana I. García, *Fac. Medicina, UBA; Dirección de Salud y Educación Ambiental ACUMAR*

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

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

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

##### Comité de apoyo

Julietta Borello, *Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR)*

Gabriela Fiorenza Biancucci, *Fac. Medicina, Univ. Nac. del Litoral*

Patricia Lucero, *Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR)*

Vanessa Oliveira, *Prog. Nac. Control Enf. Zoonóticas (ProNCEZ), MSAL de la Nación*

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

Edda C. Villaamil Lepori, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

##### Comité editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

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

José A. Castro, *Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF, exCITEFA), CONICET, Argentina*

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

Heraldo N. Donnenwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

Gina E. D'Suze García, *Inst. Venezolano de Investigaciones Científicas (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, *Inst. Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela*

Francisco O. de Siqueira França, *Instituto Butantan, Brasil*

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

Norma Vallejo, *Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina (SEDRONAR), Argentina*

Eugenio Vilanova Gisbert, *Universidad Miguel Hernández, España*

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

Eduardo N. Zerba, *Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) CITEDEF (exCITEFA), CONICET, Argentina*

## INDICE (CONTENTS)

### Artículos originales

Evaluación toxicológica y de metales (Cu, Pb, Ni, Zn y Cd) en el sedimento del reservorio Paiva Castro en Mairiporã-SP, Brasil <i>Silva, D.C.V.R.; Queiroz, L.G.; Sager, E.A.; Cardoso-Silva, S.; Kofuji, P.Y.M.; Paiva, T.C.B.P.; Pompêo, M.L. ....</i>	1
Scorpion stings in Buenos Aires, Argentina: Epidemiological and clinical aspects <i>Fernández, Marisa L.; Lloveras, Susana C.; Falcone, Claudia; González, Gustavo; Garro, Santiago; Martino, Olindo; Orduna, Tomas A. ....</i>	12
Validación de un método para la determinación del ácido 3-fenoxibenzoico en orina por QuEChERS, microextracción líquido-líquido dispersiva y cromatografía líquida de alta resolución-arreglo de diodos <i>Herrero, Florencia; Rodríguez, María Soledad; Cañas, Ana Irene; Lucero, Patricia Antonia ....</i>	19
Revisiones	
Hidroarsenicismo: mecanismos de acción asociados a la toxicidad del arsénico <i>Olmos, Valentina; Ridolfi, Adriana S. ....</i>	32
Instrucciones para los autores .....	45

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](http://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

### Evaluación toxicológica y de metales (Cu, Pb, Ni, Zn y Cd) en el sedimento del reservorio Paiva Castro en Mairiporã-SP, Brasil

#### Toxicological and metal evaluation (Cu, Pb, Ni, Zn and Cd) in the sediment of Paiva Castro reservoir, in Mairiporã-SP, Brasil

\*Silva, D. C. V. R.<sup>1</sup>; Queiroz, L. G.<sup>2</sup>; Sager, E. A.<sup>3</sup>; Cardoso-Silva, S.<sup>4</sup>; Kofuji, P. Y. M.<sup>2</sup>; Paiva, T. C. B. P.<sup>2</sup>; Pompêo, M. L. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ecology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Engineering School of Lorena, University of São Paulo, Lorena, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Department of Basic Sciences, University of Lujan, Lujan, Argentina. <sup>4</sup>Environmental Sciences Program, São Paulo State University - UNESP, Sorocaba- SP, Brazil

\*clemente.daniel@ib.usp.br

Recibido: 16 de mayo de 2015

Aceptado: 1 de mayo de 2018

**Resumen.** El hombre ha cambiado el ambiente para sostener la demanda global de recursos naturales como el agua. La gestión de los cuerpos hídricos tiene que ser constante, con el propósito preventivo y correctivo, dependiendo del estado de antropización de cada sistema. El objetivo de este artículo fue analizar la toxicidad del sedimento y los metales Mn, Zn, Pb, Ni, Cd y Cu, en el reservorio Paiva Castro, que abastece la Region Metropolitana de São Paulo. Se realizaron 2 muestreos (Mayo 2011, estación seca y Enero de 2012, estación húmeda) y se analizaron 5 puntos próximos a la captación de agua por la Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Se realizaron ensayos de toxicidad aguda y crónica en sedimento, a través de ensayos biológicos con el cladóceros *Daphnia similis* y el insecto *Chironomus xanthus*. El tratamiento de datos se realizó con el test de Fisher (mortalidad). El nivel de asociación entre las variables en sedimento y en los test ecotoxicológicos fueron evaluados por test no-paramétricos, a través del coeficiente de correlación de Spearman's. Los resultados del presente trabajo señalaron bajas concentraciones de metales en el sedimento del área de estudio y ausencia de toxicidad en los organismos ensayados. Se puede concluir que área estudiada del reservorio Paiva Castro se encuentra poco impactada por los metales, sin efectos directos sobre la calidad de vida los organismos bentónicos: *D. similis* y *C. xanthus*.

**Palabras clave:** Limnología; Ecotoxicología; Reservorios; Sedimentos

**Abstract.** Man had changed the natural environment in an attempt trying to supply the global demand for resources. The management of the hydric bodies has to be constant, with preventive and corrective purpose, depending on the eutrophization state of each one. The objective of this article was to analyze the sediment toxicity and the metals Mn, Zn, Pb, Ni, Cd and Cu, in the Paiva Castro reservoir, that supply the Metropolitan Region of São Paulo. It was made 2 collections (May 2011, dry season and January 2012, wet season). It was analyzed 5 points next to the water captation station by the Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. The sediment was analyzed as for acute and chronic toxicity through bioassays with the cladocerans *Daphnia similis* and the insect *Chironomus xanthus*. Data treatment was done with Fisher Exact Test (mortality). The association level between the variables in sediment and ecotoxicological tests was available in non-parametric tests, through the Spearman's correlation coefficient. Oriented on the results presented in this work, pointing low concentrations of heavy metals in the sediments presented in the collect local, and the absence of toxicity, we can say that at this reservoir, at least in the collect area, it's low impacted, not implicating in direct interferences in the quality of life of benthonic organisms.

**Keywords:** Limnology; Ecotoxicology; Reservoir; Sediments

### Introducción

En la actualidad muchos de los problemas ambientales relativos al agua se deben a actividades antrópicas. El hombre modifica el ambiente en su intento por suplir la demanda global de recursos naturales. El agua es un recurso esencial para la vida en la tierra y como resultado del crecimiento demográfico y económico del último siglo, aumentó la demanda global de agua (Biemans y col. 2011).

En relación al abastecimiento de agua potable, la construcción de reservorios constituyó una solución a esa mayor demanda, una vez que el aglomerado de personas crecía sustancialmente. De esta forma, con la acumulación de agua en regiones estratégicas, su distribución puede ser controlada, y las aguas pueden ser conducidas por largas distancias, abasteciendo así regiones con mayor déficit hídrico.

El perímetro urbano del municipio de Mairiporã (São Paulo, Brasil), en donde está inserto el reservorio de Paiva Castro contaba, en 1970, con una población de 4.000 habitantes (Ab'sáber 1978) y en 2013 alcanzaba los 86.240 habitantes (Fabhat 2013).

El reservorio Paiva Castro es el último que compone el Sistema Cantareira, un sistema compuesto por una serie de cinco reservorios interligados por túneles y canales, construidos para abastecer la Región Metropolitana de São Paulo (RMSP) (Whately y Cunha 2007). Para el período de 2004-2012, el reservorio Paiva Castro tuvo flujo medio de salida de 30,85 m<sup>3</sup>/s, con tiempo de residencia de 10,7 días (Agência Nacional de Águas). En la actualidad el agua producida por el sistema Cantareira abastece 8,8 millones de personas residentes en las zonas norte, centro, parte del este y oeste de la capital y los municipios de Franco da Rocha, Francisco Morato, Caieiras, Osasco, Carapicuíba y São Caetano do Sul y regiones de Guarulhos, Barueri, Taboão da Serra y Santo André (Whately y Cunha 2007). Son pocos los estudios realizados en este reservorio, destacándose Cardoso-Silva (2013) y Silva (2013), que analizaron el agua y sedimento.

La autorización para la derivación de agua para la RMSP de hasta 33 m<sup>3</sup>/s fue dada por la ley n° 750, en el Ministerio de las Minas y Energía, de 1974. El mismo establecía un plazo de 30 años de vigencia, pero con la necesidad de renovación de aquella autorización. La Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), protocolizó junto a el Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE) y a la Agência Nacional de Águas (ANA) un pedido de licencia de derecho de usos de recursos hídricos para continuar realizando esta derivación (ANA 2004). Con la legislación pertinente, entrada en vigor en el municipio de Mairiporã, se encuentra el 80,1% de su área total bajo la protección de los manantiales. Sin embargo, el embalse no está a salvo de los problemas generados por una urbanización desenfrenada (Giatti 2000).

Uno de los principales problemas que impacta sobre el reservorio es que se a intensificado su uso. Es posible observar el surgimiento de complejos inmobiliarios residenciales y de ocio. Se estableció un proceso creciente de ocupación del suelo entorno de los reservorios de toda la región. Dicha utilización ocurre sin la debida planificación y puede acarrear impactos negativos para la calidad del agua en el sistema (Whately y Cunha 2007).

La ausencia de planificación en la utilización y ocupación se puede comprobar por la baja cobertura de servicios de recolección y tratamiento de aguas residuales en los municipios de la región. Varios municipios destinan las aguas residuales a ríos y arroyos que alimentan el sistema, sin ningún tratamiento previo (Whately y Cunha 2007).

Los cuerpos hídricos, también están formados por el sedimento que se encuentra en el lecho, de forma el agua circundante y el sedimento interactúan como un todo, dependiendo de las condiciones ambientales a las que son sometidos (Esteves 2011).

El sedimento puede actuar como depósito de metales que se van acumulando con el tiempo y son responsables del transporte de muchos contaminantes (Saleem y col., 2018). Dependiendo de las condiciones ambientales, tales como cambio de pH y condiciones de anoxia, el sedimento puede convertirse en fuente de sustancias tóxicas para la columna de agua, causando una alteración general en las condiciones del sistema. Además, elevadas concentraciones de estas sustancias pueden causar toxicidad y tener impacto en la supervivencia y crecimiento de los organismos bentónicos (Dornfeld 2006; Gao y col. 2018).

Los metales pueden encontrarse en la naturaleza (metales traza) o principalmente tienen origen en la emisión antropogénica, siendo omnipresentes en el ambiente. Estos contaminantes, asociados a los sedimentos, pueden influir en las concentraciones de metales tanto en la columna de agua como en la biota, si se pueden absorber o pueden quedar disponibles para los organismos bentónicos (Milenkovic y col. 2005). Los metales pesados son, en su mayoría, tóxicos, persistentes y no degradables en los ecosistemas acuáticos. La concentración de estos contaminantes en ecosistemas naturales es generalmente baja, pero las fuentes antropogénicas pueden aumentar sus concentraciones de forma considerable. Estos metales ingresan a los ecosistemas acuáticos a través de fuentes puntuales, como desechos industriales, municipales y domésticos, y fuentes difusas, como escorrentía superficial, erosión del suelo y deposición atmosférica (Saleem y col. 2018; Pal y Maiti 2018).

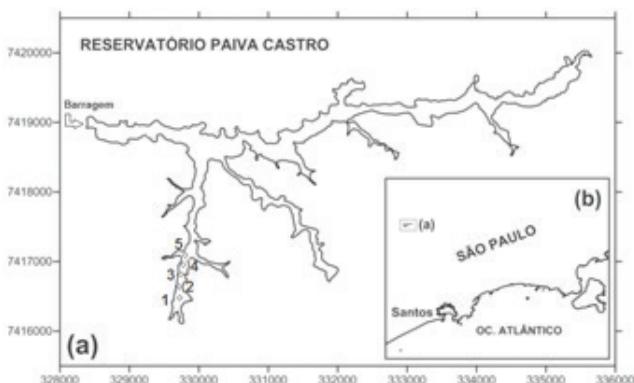
En este sentido, los análisis ecotoxicológicos y físicos-químicos son fundamentales para la caracterización del sedimento para informar del nivel de polución al cual está sometido. La gestión de los cuerpos hídricos debe ser cons-

tante, con propósito preventivo y correctivo. El presente trabajo tuvo por objetivo determinar la concentración de metales encontrados en el sedimento del reservorio Paiva Castro, y correlacionar los elementos con los datos obtenidos en pruebas de toxicidad con el cladócero *Chironomus xanthus* y el insecto *Chironomus xanthus*.

### Materiales y métodos

El estudio se realizó en el reservorio Paiva Castro (figura 1), situado en el municipio de Mairiporã (São Paulo, Brasil).

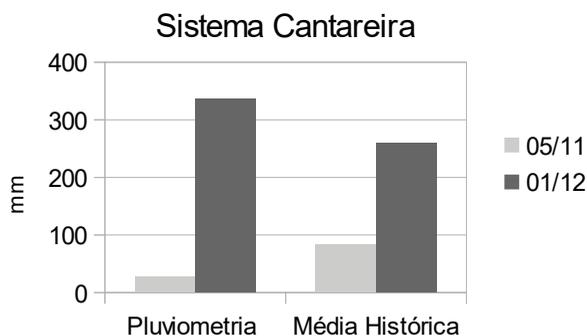
Los muestreos fueron realizados en el área



**Figura 1.** Reservorio Paiva Castro a) Puntos de toma de muestras b) Localización geográfica (São Paulo, Brasil). Los puntos de toma de muestras fueron georeferenciados de acuerdo con sistemas de coordenadas UTM (datum SAD69 y meridiano central 45°).

de captación de agua para ser enviada (a través de una plataforma elevadora) al reservorio Santa Inés, y de allí el agua es tratada y ofrecida a la población.

Se realizaron muestreos en el periodo seco, mayo del 2011, y en periodo lluvioso, en enero de 2012, según la media histórica de precipitación para el lugar (figura 2).



**Figura 2.** Datos pluviométricos del sistema Cantareira en el periodo de mayo de 2011 y Enero de 2012. Fuente: Sabesp (Sin fecha).

En los periodos de estudios se tomaron muestras de 5 puntos en las respectivas coordenadas: (1) 0329445, 7414987; (2) 0329357, 7415202; (3) 0329413, 7415264; (4) 0329415, 7415110; y (5) 0329412, 7415356, siendo las muestras de sedimento colectadas con un recolector Eckman-Birge (análisis ecotoxicológicos) y Ambühl Bühler (análisis de metales).

El sedimento recolectado (región neferomérica entre 0-3 cm) fue utilizado en la determinación de metales (Mn, Zn, Pb, Ni, Cd y Cu), materia orgánica, granulometría y pruebas ecotoxicológicas. Durante el muestreo fueron realizadas in situ medidas de pH y temperatura en el primer centímetro de la capa de sedimento. Las muestras fueron entonces almacenadas en potes de polietileno previamente esterilizados (HNO<sub>3</sub> 10% v/v) y acondicionadas en ambiente refrigerado a aproximadamente 4 °C, hasta el momento de análisis.

Los valores utilizados para analizar el grado de contaminación por los metales, con vistas a la protección de la biota acuática, fueron los establecidos por el *Canadian Council of Ministers of Environment – CCME* (1999). Basados en concentraciones totales y en la probabilidad de ocurrencia de efecto nocivo sobre la biota, el menor límite – TEL (*Threshold Effect Level*) o el nivel 1, representa la concentración que por debajo, no hay efectos adversos para los organismos. El mayor límite – PEL (*Probable Effect Level*) o nivel 2, representa la concentración encima de la cual son esperados efectos adversos en los organismos. Los valores de toxicidad entre TEL y PEL son considerados inciertos (Tabla 1). Las cantidades de metales fueron comparados también con valores de referencia establecidos para la represa Paiva Castro (Cardoso-Silva, 2013).

**Tabla 1.** Valores guías de calidad del sedimento para metales TEL (*Threshold Effect Level*) y PEL (*Probable Effect Level*) (CCME, 1999) y valores de referencia (VR) regionales establecidos para la represa Paiva Castro (Cardoso-Silva, 2013). Valores expresados en mg.kg<sup>-1</sup>.

Metales	TEL	PEL	VR
Cadmio - Cd	0,6	3,5	-
Plomo - Pb	35,0	91,3	24,0
Cobre - Cu	35,7	197,0	14,0
Níquel - Ni	18,0	35,9	28,0
Zinc - Zn	123,0	315,0	61,0
Manganeso - Mn	-	-	378,0

En laboratorio las muestras fueron secadas en estufa a 60 °C por 48 hs, y después de eso fueron maceradas. La extracción de los metales ocurrió a través de la digestión ácida con HNO<sub>3</sub> en un bloque digestor. Para el análisis se siguió el protocolo 3050-B estipulado por la USEPA (1996). Las lecturas de las muestras fueron hechas en espectrofotómetro de absor-

ción atómica (AAS), Thermo Série S, y los resultados expresados en mg.kg<sup>-1</sup>.

La exactitud y precisión de los datos fueron determinados con material certificado de referencia SS1 (suelos de la EnviroMAT™). En la tabla 2 están representadas la media, desviación estándar, precisión y exactitud obtenidos para los análisis del material certificado de referencia.

**Tabla 2.** Valores (mg.kg<sup>-1</sup>) obtenidos para el material de referencia (SS1).

Metal	Concentración certificada (mg/kg)	Concentración medida (mg/kg)	Precisión (RSD)%	Exactitud (RE) %	(n)
	SS1	SS1	SS1	SS1	
Cd	34	32,3±2.4	6,3	5,9	3
Cu	690	688,8±7.6	1,1	0,2	3
Ni	231	234,1±18.0	7,7	1,4	3

Para el análisis granulométrico se utilizó el método de tamización mecánica según Suguio (1973), realizando el pesaje de sub-muestras de 100g de sedimento seco. En este análisis las partículas fueron clasificadas conforme el tamaño: arena gruesa (>0,2 a 2,0 mm), arena fina (>0,07 a <0,2 mm) y limo + arcilla (inferior a 0,07 mm).

En los análisis ecotoxicológicos fue utilizado el microcrustáceo *Chironomus xanthus* para la evaluación de la toxicidad aguda según la norma ABNT 12713 (Associação Brasileira de Normas Técnicas 2009) y el insecto *Chironomus xanthus* para la evaluación de la toxicidad crónica según el protocolo concebido por Fonseca (1997). Ambos organismos cultivados en laboratorio.

Para la determinación de la toxicidad aguda, neonatos de *D. similis* con edad entre 8 y 24 horas fueron expuestos por un período de 48 horas, a 23 ± 2 °C y fotoperíodo 12-12 h, al elutriado obtenido a partir de las muestras de sedimento. La toxicidad crónica fue determinada utilizando larvas del 2° estadio de *C. xanthus*. Estas larvas fueron colocadas en recipientes con 75 g de sedimento de la represa Paiva Castro. La exposición ocurrió por un período de 8 días. Al final de los ensayos, agudo y crónico, se evaluó la mortalidad e inmovilidad de los organismos. Los resultados se expresaron como "tóxicos" y "no tóxicos".

Los datos obtenidos en las pruebas ecotoxicológicas, proceden de los ensayos agudos y crónicos, realizados para verificar la existencia de diferencias significativas entre las estaciones de recolección y el control; agua de cultivo (*D. similis*) y arena de cultivo (*C. xanthus*) de laboratorio. Se utilizó el software TOXSTAT versión 3.4®, con Fisher Exact test p<0,05 para análisis de mortalidad/inmovilidad. Para los análisis estadísticos, los valores de las variables fueron estandarizados por la amplitud de variación - *ranging* [(X - X<sub>min</sub>) / (X<sub>máx</sub> - X<sub>min</sub>)].

Para el grado de asociación entre las variables físicas, químicas (metales, granulometría y cantidad de materia orgánica) y ecotoxicológicas se utilizó test no-paramétrico, a través del coeficiente de correlación de Spearman con nivel de significancia de p<0,05. Para todos los análisis se usó el paquete estadístico Statistica 7®.

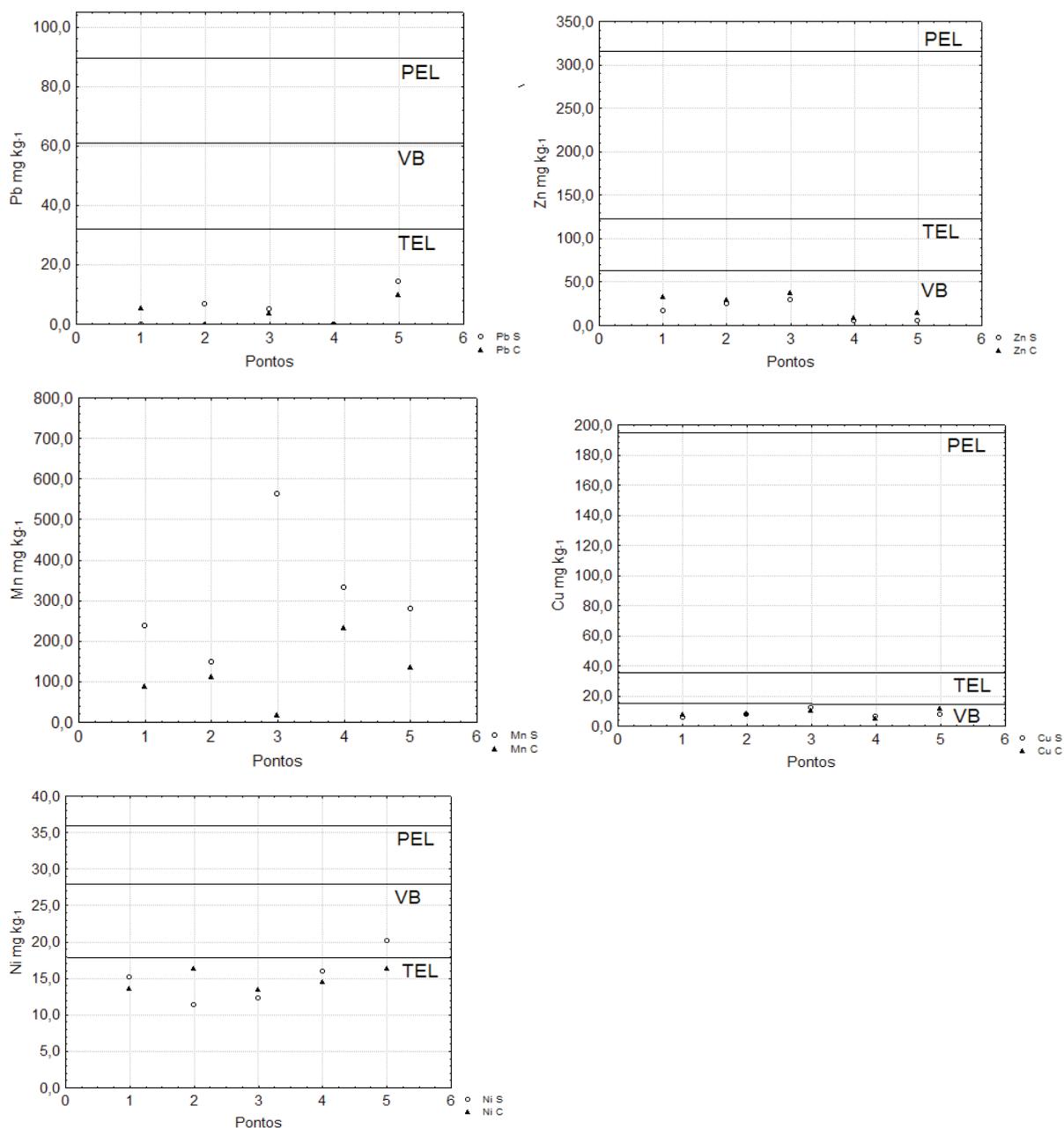
## Resultados

Las medias de los valores de pH en el sedimento del reservorio Paiva Castro en estación seca y lluviosa fueron de 6,0 y 6,5 respectivamente. En relación a la temperatura, las medias fueron en 19,0 oC (estación seca) y 20,0 oC (estación lluviosa).

La materia orgánica en estación seca fue de 7,4%, y en estación lluviosa de 9,2%. Los valores medios de arena gruesa, arena fina y limo/arcilla fueron de: 15,6%, 66% y 18,4% para la

estacion ceca y de 20,8%, 53,6% y 25,5% en la estación lluviosa, respectivamente. En total, el sedimento presentó una media de 59,8% de arena fina, 21,9% de limo y arcilla, seguido por 18,8% de arena gruesa. Las concentraciones de los metales expresa-

das en mg.kg-1, son presentadas en las tablas 3 y 4 (estación seca y lluvia). No hay valores de TEL y PEL para Mn. La ausencia de contaminación de los metales fue corroborada por la comparación de los niveles encontrados con los valores de referencia (Figura 3).



**Figura 3.** Cantidades de metales en los sedimentos del área de captación de la represa Paiva Castro. VB: valores basales determinados por Cardoso-Silva (2013). Valores de TEL (*Threshold Effect Level*) y PEL (*Probable Effect Level*) (CCME).

**Tabla 3.** Concentraciones medias de metales (mg.kg-1) en los sedimentos del área de captación de la represa Paiva Castro en el periodo de seca.

Metal	Media	V <sub>Min</sub>	V <sub>Max</sub>	DE	TEL	PEL	VR
Cd	0,07	0,0	0,34	0,15	0,6	3,5	-
Cu	7,91	5,97	11,92	2,41	35,7	197,0	14,0
Ni	14,98	11,31	20,11	3,46	18,0	35,9	28,0
Mn	311,92	148,15	563,46	155,84	-	-	378,0
Pb	5,42	0,0	14,21	5,70	35,0	91,3	24,0
Zn	16,32	5,27	30,0	11,11	123,0	315,0	61,0

V<sub>Min</sub>: Valor mínimo; V<sub>Max</sub>: Valor máximo; DE: Desviación estandar; TEL: Threshold Effect Level; PEL: Probable Effect Level; VR: Valor de referencia.

**Tabla 4.** Concentraciones medias de metales (mg.kg-1) en los sedimentos del área de captación de la represa Paiva Castro en el periodo de lluvia.

Metal	Media	V <sub>Min</sub>	V <sub>Max</sub>	DE	TEL	PEL	VR
Cd	3,26	2,10	4,01	0,70	0,6	3,5	-
Cu	8,41	4,76	11,21	2,46	35,7	197,0	14,0
Ni	14,90	13,46	16,48	1,45	18,0	35,9	28,0
Mn	117,13	17,64	232,33	77,94	-	-	378,0
Pb	3,35	0,0	9,76	3,76	35,0	91,3	24,0
Zn	24,82	8,32	37,46	12,50	123,0	315,0	61,0

V<sub>Min</sub>: Valor mínimo; V<sub>Max</sub>: Valor máximo; DE: Desviación estandar; TEL: Threshold Effect Level; PEL: Probable Effect Level; VR: Valor de referencia.

Los resultados de los análisis ecotoxicológicos se presentan como diferencia “significativa” o “no significativa” en relación al control, es decir como “tóxico” o “no tóxico” (Tabla

5). Sólo un punto presentó efecto tóxico agudo en sedimento, en la estación lluviosa. No se registraron efectos de toxicidad en los test crónicos.

**Tabla 5.** Resultado de los bioensayos agudo y crónico del sedimento en el periodo seco y lluvioso.

Punto	Test Agudo		Test Crónico	
	Seca	Lluvia	Seca	Lluvia
PC1	NT	NT	NT	NT
PC2	NT	NT	NT	NT
PC3	NT	NT	NT	NT
PC4	NT	TOX	NT	NT
PC5	NT	NT	NT	NT

Se evidenciaron correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre las variables analizadas en el sedimento (Tabla 6).

**Tabla 6.** Coeficiente de correlación de Spearman entre las variables de la Represa Paiva Castro con correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ).

	AG	AF	L+A	Ni	Zi	Cu	TAS
AG	-	-0,7	*	-0,77	*	*	*
AF		-	*	0,79	-0,81	*	-0,7
S+A			-	*	0,79	0,79	*
Ni				-	*	*	*
Zi					-	*	*
Cu						-	*
TAS							-

Notas: AG = Porcentaje de Arena Gruesa; AF = Porcentaje de Arena Fina; L/A = Limo/Arcilla; Ni = Níquel Zi = Zinc; Cu = Cobre; TAS = Test Agudo Sedimento. Los parámetros arena gruesa, arena fina, y Ni se correlacionaron negativamente con  $r = -0,70$   $-0,77$ , respectivamente. El parámetro arena fina se correlacionó negativamente con Zn y con el test agudo y, positivamente con Ni ( $r = -0,81$ ;  $-0,70$ ;  $0,79$ ). Mientras que entre limo y arcilla con Zi y Cu se evidenció una correlación positiva con  $r = 0,79$  y  $r = 0,79$  respectivamente.

## Discusión

Los metales son elementos importantes y esenciales en los ecosistemas acuáticos cuando se encuentran en pequeñas concentraciones, pero en altos niveles, muchos son tóxicos y pueden bioacumular y biomagnificarse en las cadenas alimenticias. En estos ambientes, los metales pueden estar de forma libre en solución, en forma de complejos con la materia orgánica disuelta, o coloides en el agua intersticial ligados a las partículas del sedimento (Lamberson y col. 1992; Luoma y Rainbow 2008; Zhang y col. 2014).

El sedimento está formado por extractos de partículas minerales y orgánicas, que se encuentran en contacto con el hipolimnion. En relación a la granulación sedimentaria, se sabe que uno de los parámetros que más afecta a las interacciones del metal con el sedimento es el tamaño de la partícula del sedimento (Luoma y Rainbow 2008; Zhang y col. 2014). La interacción se relaciona con que a mayor área superficial de los sedimentos finos, mayor capacidad de adsorción del sedimento, llevando a la inmovilización de estos elementos en el sedi-

mento de la represa (Cardoso-Silva y col. 2016; Kang y col. 2017). Para metales en particular, se sabe que existe mayor afinidad en sedimentos compuestos por grandes concentraciones de limo, arcilla y materia orgánica - fracción menor que  $63 \mu\text{m}$  (Araújo y col. 2006; Campana y col. 2012; Zhang y col. 2014). En los reservorios, la granulometría tiende a ser menor conforme se aproxima a la presa, ya que la decantación de las partículas que entran en el sistema ocurre de manera más lenta mientras menor es el tamaño de la partícula, por lo que puede existir un gradiente de concentración de contaminantes en el sedimento desde la cabecera hacia el sitio próximo a la presa.

Podemos señalar el sedimento del sitio de estudio con bajo poder de adsorción de metales, debido a que su material particulado posee granulometría con fracción predominantemente mayor que  $63 \mu\text{m}$ , es decir, con predominio de la fracción arena. A pesar del bajo porcentaje de la presencia de la fracción menor que  $63 \mu\text{m}$  en el reservorio, se observó que los metales Zi y Cu se correlacionaron positivamente con la arcilla presente en el lugar. Al evaluar la presencia de metales en los sedimentos de la represa Paiva Castro, Cardoso-Silva y col. (2016) observaron una correlación positiva entre Cu y arcilla, relacionando con la aplicación de  $\text{CuSO}_4$  como algicida en el área de estudio.

La cantidad de materia orgánica en el sedimento es un parámetro importante, ya que regula la sorción y biodisponibilidad de diversos contaminantes (Power y Chapman, 1992; USEPA, 2005; Zhang y col. 2014). Según Viganò y col. (2007) la materia orgánica y los nutrientes pueden causar gran influencia en los ambientes acuáticos, a través de la interacción con los productores primarios y consumidores primarios. De este modo, se ha dado gran atención los materiales particulados ya que puedan ser una fuente contemporánea de energía y tóxicos para la cadena alimentaria (Viganò y col. 2007). Para ser considerado orgánico, el sedimento debe contener más de 10% de materia orgánica en su peso seco (Esteves 2011), mientras que la materia orgánica en el sitio de estudio fue de 8,3%. Por lo tanto, los resultados evidencia baja asociación del sedimento de este reservorio con los metales aquí analizados.

Silva (2013), en su trabajo sobre los Reservorios Guarapiranga y Billings identificó el sedimento de ambos sitios como orgánico, con más de 10% de cantidad de materia orgánica, y con concentraciones medias superiores a 30% de

limo y arcilla. Hubo correlaciones significativas del sedimento de los reservorios Guarapiranga y Billings con varios metales analizados. Además, factores de transporte y carga causados en otros ríos pueden dificultar la sedimentación y retención de materia orgánica en el sedimento. La cuenca del Río Piracicaba, por ejemplo, estudiada en el año 2000, reveló que la cantidad de materia orgánica en el sedimento tuvo variación de 1,2% y 15,5%. Los valores encima de 10% fueron observados en represas menores, y los valores menores en los ríos (Del Grande 2003). En el presente estudio, el área de muestreo posee un brazo estrecho de captación, con una considerable corriente y flujo de agua, por lo que las condiciones locales parecidas con ambientes lóticos explicaría la mayor granulometría del sedimento y menor cantidad de materia orgánica.

Un factor que pudo interferir en la cantidad de materia orgánica, es la concentración de O<sub>2</sub> en el sedimento y en la interface de éste con el agua, que puede llevar a una degradación más rápida de materia orgánica y finalmente a una reducción en la cantidad de ésta (Delistraty y Yokel 2007).

Según Araújo y col. (2006), la toxicidad de los contaminantes puede verse afectada dependiendo de las características de los extractos minerales y orgánicos, así como a la complejación y biodisponibilidad del contaminante. Delistraty y Yokel (2007) sugieren que los sedimentos causan efectos adversos en la biota que vive en ese compartimento, siendo que los riesgos parecen estar asociados a los metales y factores como baja cantidad de O<sub>2</sub> y altas cantidades de amonio. Una vez más vemos que en ambientes lóticos, la dinámica local influye positivamente los patrones de toxicidad del sedimento.

Las áreas lóticas tienden a acumular menores cantidades de metales, en este sentido Kemble y col. (2013) obtuvieron un número limitado de correlaciones significativas entre la toxicidad y la concentración de metales en siete ríos de Norteamérica.

Rodgher y col. (2005) encontraron contaminación por metales en el sedimento y agua del lugar de estudio, causados por efluente sanitario, industrial y de agricultura. Los tests ecotoxicológicos de muchas muestras indicaron efectos tóxicos sobre los organismos bioindicadores, posiblemente resultante de la entrada constante de materia de las áreas adyacentes del reservorio.

Evidencias de toxicidad por metales en reservorios son descritas en el informe de la CETESB (2012), donde se destacan las altas concentraciones de Cu en el sedimento del reservorio Guarapiranga y la correlación de este metal con la toxicidad.

Los valores de referencia TEL y PEL sirven para comparar la existencia de posibles efectos sobre la biota en relación a la concentración de metales encontradas en el ambiente. En este sentido, los elementos Pb, Cu, Ni y Zn permanecieron por debajo de los valores de TEL, por lo que se puede concluir que el sedimento del reservorio en el área de captación para abastecimiento público no presenta potencial tóxico para los organismos bentónicos de los sitios muestreados.

Según Zagatto y Bertolotti (2008), la evaluación de la ecotoxicidad, se constituye en un abordaje exploratorio que evidencia un problema de calidad en cuerpos hídricos que reciben efluentes domésticos e industriales. En este trabajo, tales análisis fueron realizados a fin de obtener datos que señalen la calidad del sedimento del reservorio Paiva Castro y asociar posibles contaminantes con su toxicidad sobre los organismos bentónicos. En el análisis de correlación de Pearson no hubo correlaciones significativas entre la toxicidad y los metales del sedimento.

Cabe aclarar que si bien no se observó daño en los organismos ensayados, es necesario hacer un seguimiento en el tiempo del estado del reservorio ya que no de los principales problemas que los metales pesados poseen una vida media biológica larga (Milenkovic y col. 2005), es decir que una vez en el organismo, el metal puede bioacumularse por largos periodos de tiempo y puede existir procesos de biomagnificación en las redes tróficas. Por lo que sería necesario complementar el estudio con la evaluación de la presencia de metales en organismos bentónicos.

Los resultados presentados en este trabajo se señalan bajas concentraciones de metales en el sedimento, así como la ausencia de toxicidad de las especies ensayadas. En este sentido, podemos decir que el reservorio, al menos en el área de estudio, se encuentra poco impactada y no estaría produciendo interferencias directas en la calidad de vida de los organismos bentónicos.

Agradecimientos: A la FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - procesos 2009/16652-1 y 2006/51705-0), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico - processo 470443/2008-1) y Capes (Co-ordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por la beca de estudio.

## Bibliografía citada

Ab'Sáber A.N. O reservatório Juqueri na área de Mairiporã: estudos básicos para defesa ambiental e ordenação dos espaços envolventes. *Geografia e Planejamento* 1978,32:1-28.

Agência Nacional de Águas (ANA). Nota Técnica Conjunta ANA/DAEE. Subsídios para a análise do pedido de outorga do Sistema Cantareira e para a definição das condições de operação dos seus reservatórios. Julio de 2004.

Agência Nacional de Águas (ANA). Sistema Cantareira. São Paulo: ANA, 2012. (Séries dos hidrológicos). [en línea] [Consulta 16 de mayo de 2015] Disponible en: [http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sof/Renovacao\\_Outorga/SeriedeHidrologicos-SistemaCantareira-2004-2012-SABESP.xlsx](http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sof/Renovacao_Outorga/SeriedeHidrologicos-SistemaCantareira-2004-2012-SABESP.xlsx).

Araújo R.P.A., Shimizu G.Y., Bohrer M.B.C., Jardim W. Avaliação da qualidade de sedimentos. En: Zagatto P.A., Bertoletti E. *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 2006, p. 293-326.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). *Ecotoxicologia aquática – Ensaio de toxicidade aguda com Chironomus xanthus* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea). Norma NBR 12713:2009. Rio de Janeiro, ABNT, p.16. 2009.

Biemans H., Haddeland I., Kabat P., Ludwing F., Hutjes, R.W.A., Heinke J., von Bloh W., Gerten D. Impact of reservoirs in river discharge and irrigation water supply during the 20th century. (2011). *Water Resour. Res.*, 47 W03509.

Cadoso-Silva S. Metais-traço em sedimentos do reservatório Paiva Castro (Mairiporã- São Paulo): histórico por meio da geocronologia do <sup>210</sup>Pb, biodisponibilidade e uma proposta para a gestão dos recursos hídricos, Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia. 2013.

Campana O., Simpson S.L., Spadaro D.A., Blasco J. Sub-lethal effects of copper to benthic invertebrates explained by sediment

properties and dietary exposure. *Environ Sci Technol* 2012;46(12):6835-42.

Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). 1999. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – Protocol of the derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life (CCME EPC-98E).

Cardoso-Silva S., Silva D.C.V.R., Lage F., Paiva T.C.B., Moschini-Carlos V., Rosa A.H., Pompeu M. Metals in sediments: bioavailability and toxicity in a tropical reservoir used for public water supply. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, p. 188-310.

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (CETESB). Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo – 2011. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, 2012.

Del Grande M. Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos na bacia do rio Piracicaba-SP – Brasil. *Química Nova*. 2003; 26(5):678-686.

Delistraty D., Yokel J. Chemical and ecotoxicological characterization of Columbia River sediments below the Hanford site (USA). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007; 66:16-28.

Dornfeld C.B. Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais, 2006. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos.

Esteves F.A. *Fundamentos em Limnologia*. 2ª Edição. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2011.

Fonseca A.C. Avaliação da qualidade da água na Bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados, 1997. Tese do doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos.

Fundação Agência da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê (FABHAT). Relatório de Situação dos Recursos Hídricos. Bacia Hidrográfica do Alto Tietê. Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) 06. 2013.

Gao L., Wang Z., Li S., Chen J. Bioavailability and toxicity of trace metals (Cd, Cr, Cu, Ni, and Zn) in sediment cores from the Shima River, South China. *Chemosphere*. 2018;192:31-42.

Giatti L.L. Reservatório Paiva Castro Mairiporã – SP. Avaliação da qualidade da água sobre alguns parâmetros físicos, químicos e biológicos (1987/1998), 2000. Dissertação de Mestrado. USP.

Kang X., Song J., Yuan H., Duan I., Li X., Li N., Liang X., Qu B. Speciation of heavy metals in different grain sizes of Jiaozhou Bay sediments: Bioavailability, ecological risk assessment and source analysis on a centennial timescale. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017;143:296-306.

Kemble N.E., Hardesty D.K., Ingersoll C.G., Kunz J.L., Silbey P.K., Calhoun D.L., Gilliom R.J., Kuivila K.M., Nowell L.H., Moran P.W. Contaminants in stream sediments from seven United States metropolitan areas. Part II – Sediment toxicity to the amphipod *Hyalella azteca* and the midge *Chironomus dilutus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2013;64:52-64.

La Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP). Datos pluviométricos del sistema Cantareira en el período de mayo de 2011 y enero de 2012. [en línea]. [Consulta 16 de mayo de 2015] Disponible en: <http://www2.sabesp.com.br/mananciais/DivulgacaoSiteSabesp.aspx>.

Lamberson, J.O.; Dewitt, T.H.; Swartz, R.C. 1992. Assessment of sediment toxicity to marine benthos. In: Burton JR, G.A. (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publishers Inc., Chelsea, p. 183-211. 1992.

Luoma S.N., Rainbow P.S. *Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and lateral management*. Cambridge: Cambridge University, 2008.

Milenkovic N., Damjanovic M., Ristic M. Study of Heavy Metal Pollution in Sediments from the Iron Gate (Danube River), Serbia and Montenegro 2005; 14(6):781–787.

Pal D., Maiti S.K. Seasonal variation of heavy metals in water, sediment, and highly consumed cultured fish (*Labeo rohita* and *Labeo*

*bata*) and potential health risk assessment in aquaculture pond of the coal city, Dhanbad (India). *Environmental Science and Pollution Research*, 2018.

Power E.A., Chapman P.M. Assessing sediment quality. En: Burton Jr, A.G. *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers, INC. 1992.

Rodgher S., Espíndola E.L.G. Suitability of *Chironomus xanthus* as a alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. In: *Ecotoxicology*. 2010;19:1027-1033.

Saleem M., Iqbal J., Akhter G., Shah M.H. Fractionation, bioavailability, contamination and environmental risk of heavy metals in the sediments from a freshwater reservoir. *Journal of Geochemical Exploration*. 2018;184:199-208.

Silva D.C.V.R. Toxicidade da água e sedimento dos reservatórios Guarapiranga, Billings e Paiva Castro, na região metropolitana de São Paulo-SP. Dissertação de Mestrado. USP. 2013.

Suguio K. *Introdução à sedimentologia*. Edgard Blücher, s.d., 1973.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Acid digestion of sediments, sludge's and soils. Method 3050B, 1996.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Procedure for the derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the protection of benthic organisms: metal mixtures (cadmium, cooper, lead, nickel, silver and zinc. Office of Research and Development. 2005.

Viganò L., Farkas A., Guzzella L., Roscioli D., Erratico C. The acumulation levels of PAHs, PCBs and DDTs are related in an inverse way to the size of a benthic amphipod (*Echinogammarus stammeri* Karaman) in the River Po. *Science of the Total Environment*. 2007;373:131-145.

Whately M., Cunha P. Cantareira 2006: um olhar sobre o maior manancial de água da região metropolitana de São Paulo-SP. Resultados do Diagnóstico Socioambiental Participativo do Sistema Cantareira. São Paulo: Instituto Socioambiental. 2007.

Zagatto P.A., Bertolleti E. Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações. 2<sup>a</sup> ed. Rima Editora. São Carlos-SP, 2008.

Zhang C., Yu Z., Zeng G., Jiang M, Yang Z., Cui F., Zhu M., Shen L., Hu L. Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. *Environment International*. 2014;73:270–281.

## Scorpion stings in Buenos Aires, Argentina: Epidemiological and clinical aspects Picaduras de escorpión en Buenos Aires, Argentina: aspectos clínicos y epidemiológicos

Fernández, Marisa L.; Lloveras, Susana C.; Falcone, Claudia; González, Gustavo; Garro, Santiago; Echazarreta, Sofía; Martino, Olindo†; Orduna, Tomas A.

Centro Municipal de Patología Regional Argentina y Medicina Tropical (CEMPRA-MT), Hospital de Infecciosas F.J. Muñiz, Uspallata 2272, (C1282ADE) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. †in memoriam

cempramt@intramed.net

Recibido: 3 de febrero de 2018

Aceptado: 1 de mayo de 2018

**Abstract.** In Argentina scorpion stings are the leading cause of venom-related injury to human. Since the beginning of the 20th century *Tityus trivittatus* is found in Buenos Aires. Scorpion envenomation is a neurotoxic syndrome with local symptoms and systemic manifestations. It could develop cardiac failure, acute pulmonary edema, shock and death. Fortunately, most of the scorpion stings in adult people in Buenos Aires are mild envenomations. A retrospective, descriptive and cross sectional study based on data collected from medical records of patients followed between 1982 and 2013 were done. We compiled a total of 141 human scorpion stings and 115 arthropod captures: 88 *T. trivittatus*, 10 *Bothriurus bonariensis* and 17 missed data. The accidents occurred more frequently in the eastern and oldest neighborhoods of the city. Eighteen patients had mild systemic manifestation. There was not any death. Twelve patients received scorpion antivenom. Although recently there was a severe case in 5 years old boy and in some provinces in Argentina death have been reported, most of the envenomations are mild. We observed inadequate treatment in some patients; it is important training on the correct management and prevention of this envenomation.

**Keywords:** Scorpion stings; Buenos Aires; *Tityus trivittatus*; *Bothriurus bonariensis*.

**Resumen.** En Argentina el escorpionismo es el principal envenenamiento por animales ponzoñosos. Desde comienzos del siglo XX, *Tityus trivittatus* ha sido descrito en Buenos Aires. El escorpionismo es una intoxicación que produce un síndrome neurotóxico con síntomas locales y manifestaciones sistémicas. Puede desencadenar insuficiencia cardíaca, edema agudo de pulmón, shock y muerte. Afortunadamente, la mayoría de los accidentes con escorpiones en adultos en Buenos Aires son intoxicaciones leves. Se realizó un estudio retrospectivo, descriptivo y transversal basado en información recolectada de las historias clínicas desde 1982 hasta 2013. Se recolectó información sobre un total de 141 intoxicaciones por escorpiones y 115 capturas de artrópodos: 88 *T. trivittatus*, 10 *Bothriurus bonariensis* y 17 sin identificar. Los accidentes sucedieron más frecuentemente en los barrios del este y más antiguos de la ciudad. Dieciocho pacientes tuvieron síntomas sistémicos leves. No hubo ninguna muerte. Doce pacientes recibieron antiveneno. La mayoría de los envenenamientos fueron leves, aunque recientemente se produjo un caso grave en un niño de 5 años y en algunas provincias se han registrado muertes. Hemos observado un tratamiento inadecuado en algunos pacientes por lo que consideramos que sería importante capacitar en el correcto manejo y prevención de este envenenamiento.

**Palabras claves:** Escorpionismo; Buenos Aires; *Tityus trivittatus*; *Bothriurus bonariensis*.

### Introduction

Scorpion envenomation is a major public health problem in certain parts of the world, such as North Africa and North and South America (Chippaux and Goyffon 2008; Khattabi *et al.* 2011). Although the mortality is low there is substantial morbidity and, among children, a risk of death (Isbister and Bawaskar 2014). In Argentina, scorpion stings are the leading cause of venom-related injury to the human in the last decades (Ministerio de Salud de la Nación 2011). It is an emergent public health

problem on the most important cities in the center and north of the country.

There are many different species of scorpions in the country. Some of them, such those belonging to Bothriuridae family, do not have medical importance in humans. On the other hand, members from Buthidae family, like those scorpions that constitute the *Tityus* genus, can be responsible for severe envenomation.

The species *B. bonariensis*, from Bothriuridae family, are commonly found in the sub-

urban belt around the City of Buenos Aires. The *Tityus* genus is represented by 8 species in Argentina: *T. trivittatus*, *T. confluens*, *T. argentinus*, *T. uruguayensis*, *T. bahiensis*, *T. serrulatus*, *T. paraguayensis* and *T. curupi* (Martino *et al.* 2001; de Roodt *et al.* 2003, 2014; Ojanguren-Affilastro *et al.* 2017). While *T. serrulatus* has been described in two north-east provinces (Camargo and Ricciardi 2000), along with the border with Brazil (Bortoluzzi *et al.* 2007), it would not be considered as a local established species yet.

*Tityus trivittatus*, *T. serrulatus*, *T. bahiensis* and *T. confluens* sting can be life-threatening, especially in children and elderly people with comorbidities. *T. trivittatus* is found in Buenos Aires since beginnings of the 20th century. Fortunately, most of the scorpion stings in adult people in Buenos Aires are mild envenomations. Until nowadays, it has been communicated only two severe scorpion envenomation in a 4 years-old girl in 2009 (Docampo and Fernandez 2011; Blanco *et al.* 2012) and at the beginning of 2017, in a 5 years-old boy (ATA 2018).

Scorpion envenomation is a neurotoxic syndrome with local and systemic symptoms. Usually, local pain appears immediately, it is intense and stinging, and irradiates to close anatomic areas. Discrete edema could be observed at the sting site, and occasionally is possible to localize the point of inoculation. Other local symptoms are paresthesia, pilo-erection, and chills without tissue damage. Systemic manifestations are due to neuronal excitation which results in autonomic stimulation (sympathetic and parasympathetic). They could develop cardiovascular, respiratory and/or neurological disorders with or without some general manifestations such as glandular hypersecretion, abdominal pain, muscles cramps and vomiting. Unusually, they could progress to cardiac failure, acute pulmonary edema, shock, and death, which up to date, were not observed in Buenos Aires city.

In Argentina, for therapeutic guidance and prognostic, envenomation is classified as mild, moderate and severe according to the intensity of the symptoms.

Mild: presence of local manifestations only.

Moderate: low-intensity systemic manifestations may occur, such as diaphoresis, nausea, few vomiting episodes, without cardiovascular or respiratory involvement.

Severe: systemic symptoms as alternating

agitation and prostration, vomiting episodes, excessive salivation, profuse diaphoresis, hypothermia, tachydyspnea, bronchorrhea, tachy or bradyarrhythmias, arterial hyper or hypotension and, rarely, muscle spasms and seizures.

According to Argentinean scorpion stings guidelines, moderate and severe scorpion envenomation require hospitalization in a critical care unit and early antivenom administration, while mild severity intoxication needs 6 hours observation (Boyer *et al.* 2009; Ministerio de Salud de la Nación 2011; Blanco *et al.* 2012; de Roodt 2014).

The aims of this study were to describe clinical, epidemiological data and species of scorpions captured linked to the envenomation cases assisted at the Tropical Medicine Unit between 1982 and 2013.

## Method

This manuscript is a single-center retrospective, descriptive and cross-sectional study based on data collected from patient's medical records at the Tropical Medicine Unit between January 1982 and December 2013.

The final studied population consisted of 145 medical records, which were analyzed and reviewed using a specific research form. The variables collected from the patients were gender, age, time of sting, location of sting, clinical symptoms and treatment, and features from the accident like identification of the scorpion species, place and date of the accident.

## Results

We compiled a total of 141 human scorpion stings and four scorpion captures without stings, between 1982 and 2013.

The gender distribution of the victims was: 54% males and 46% females. The average age of the patients was 37 years old (range 1.5 - 81 years old). Scorpion stings have been mostly seen in patients between 21 - 50 years old, this group consists 71% of the population in this series. The gender distribution of the patients by age is displayed on *Figure 1*.

In the last decade, the number of notifications of scorpion envenomation has slightly increased in our series, in concordance with the observations at national level as it shows in the *Figure 2*. Seventy-one percent of the scorpion stings occurred in Buenos Aires City, 26% in the suburban belt around Buenos Aires, and 3% in other provinces. There was a total of 115

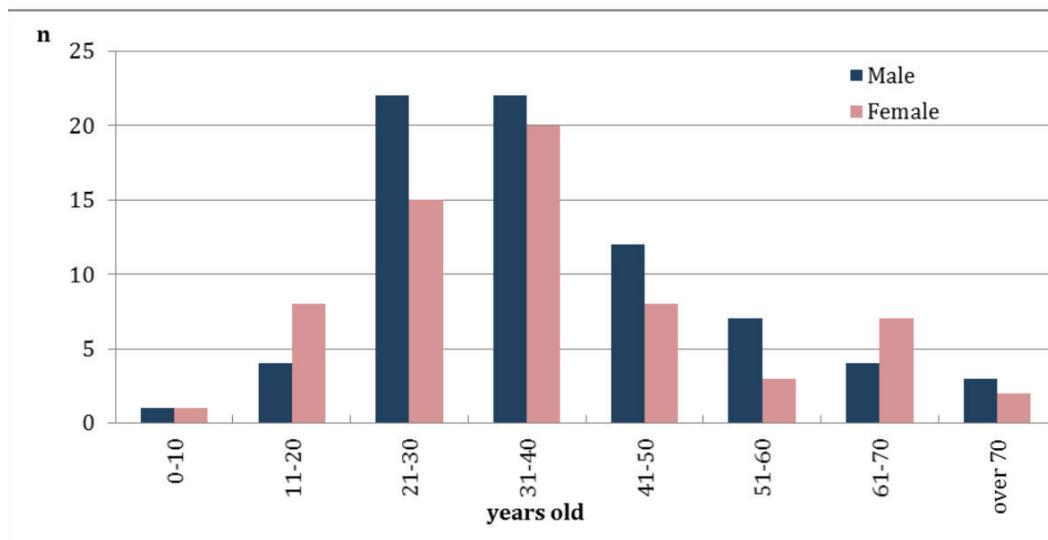


Figure 1. Gender distribution of patients by age range.

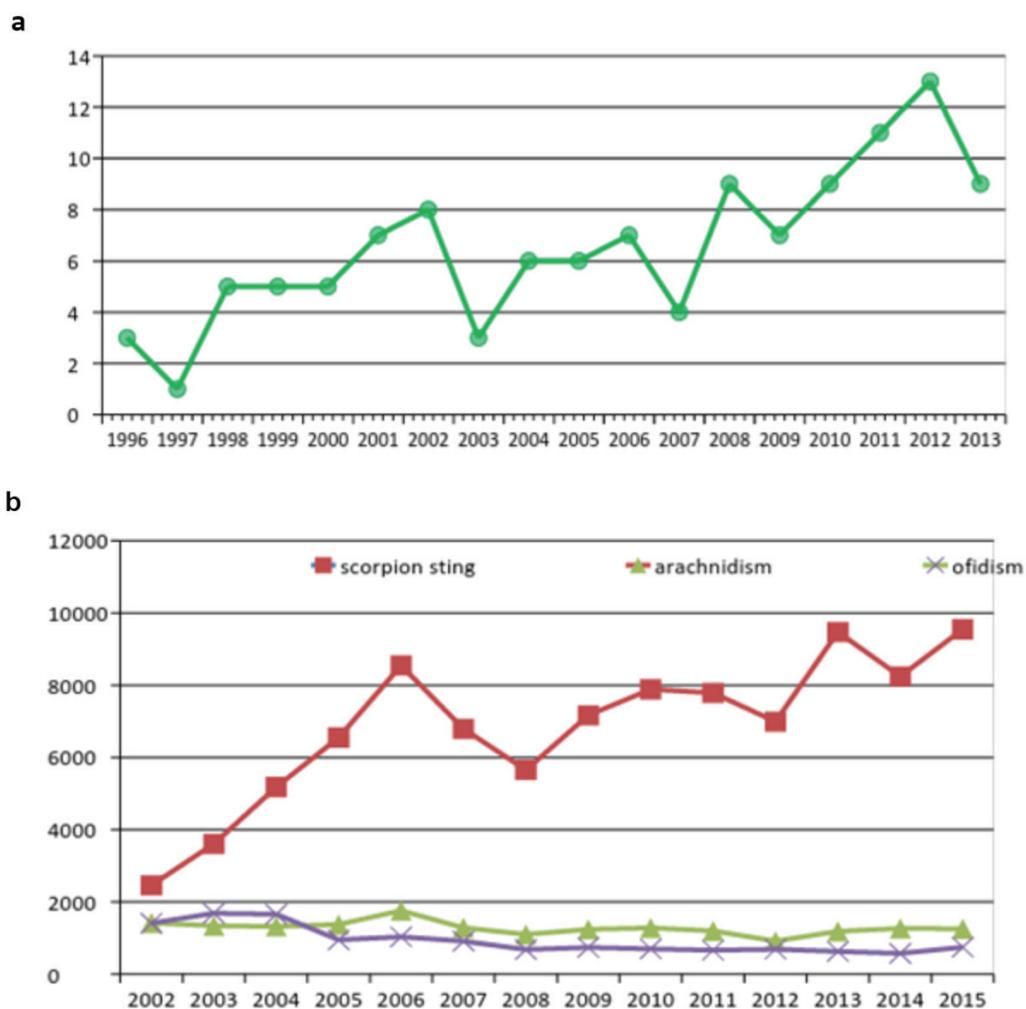


Figure 2. a) Distribution of scorpion sting notifications per year in the Tropical Medicine Unit between 1996 and 2013. b) National distribution of scorpion stings, arachnidism and ofidism per year between 2002 and 2015 (SNVS- Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud).

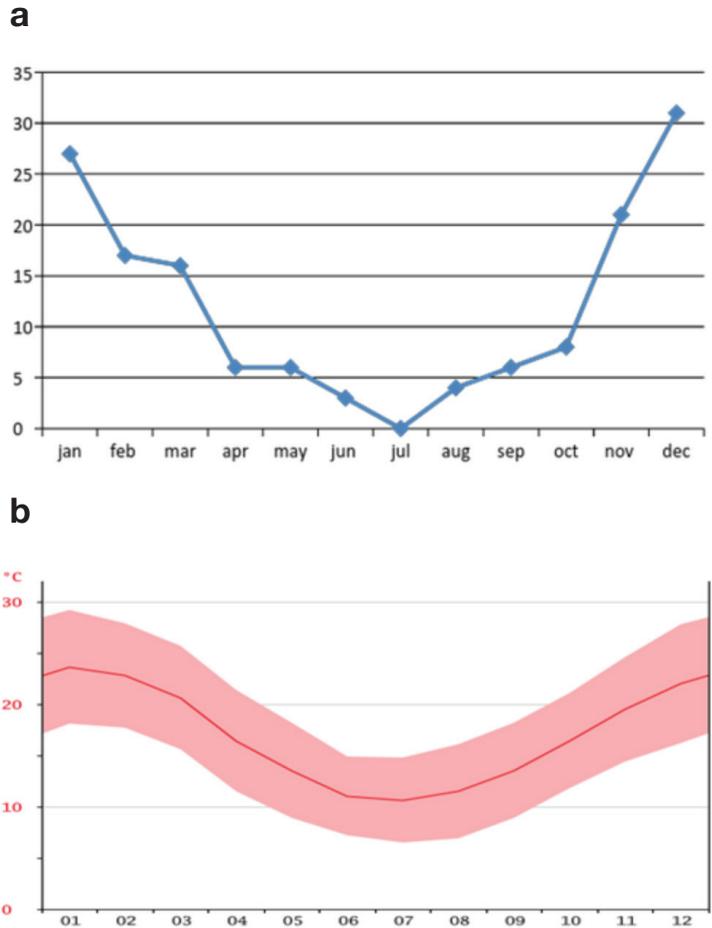
scorpion captures: 88 *T. trivittatus*, 10 *B. bonariensis* and 17 missed data. In Buenos Aires City, 99% were *T. trivittatus* and 1% *B. bonariensis*. In the suburban belt, 48% were *T. trivittatus*, 35% were *B. bonaerensis* and the rest were missed data.

The accidents occurred more frequently in the eastern and oldest neighborhoods of the city and were related to trains and metro railways as it is shown in Figure 3, as described by Blanco *et al.* (2015).

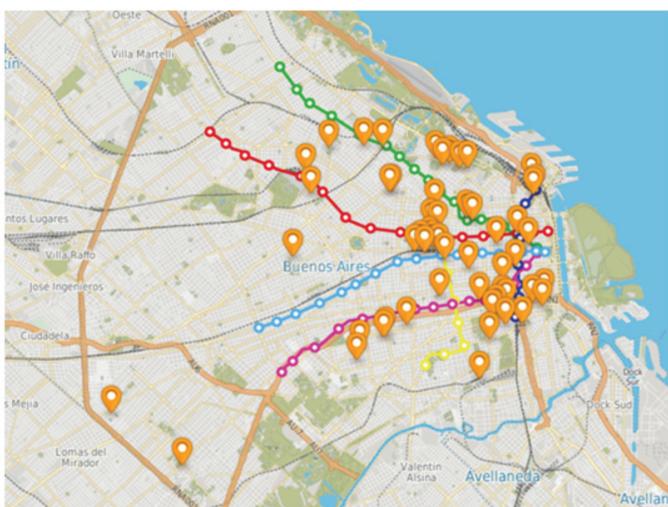
Most of the accidents (85%) occur between October and March (spring and summer season) (Figure 4).

Sixty-eight percent of the scorpions were found inside the home (40% in rooms, 18% in kitchens, 10% in bathrooms, 11% in basements, and the rest did not specify the area), 13% peri-domiciliary and 19% on the streets, pavements and squares.

The anatomical site of envenomation was available in 138 patients. The most common sites of stings were in limbs, 47% in upper limbs and 42% in lower limbs. The stings in feet were mainly due to an accidental encounter with the scorpion while putting on shoes. The accidents in hands, more frequently in women (24 women and 11 men), were due to domestic activity such as cleaning, especially while squeezing cloth, tiding and gardening. The trunk stings occurred mostly while sleeping or resting. Some uncommon stings localized in head and neck happened while sleeping.



**Figure 4.** a) Distribution of scorpion stings along the year. b) Buenos Aires City climate graph showing average temperature along the year (<http://es.climate-data.org/location/1207/>)



**Figure 3.** Scorpion location in Buenos Aires city (<https://mapa.buenosaires.gob.ar>). The subways lines are represented by green, red, light blue, pink, yellow and blue lines and the train rails by gray dotted lines.

All patients referred local symptoms, 94% had intensive pain, 55% had inflammatory signs (erythema and mild edema) and 21% had local paresthesias.

Only 18 patients had mild systemic manifestations: arterial hypertension or hypotension, tachycardia, myalgia, and sialorrhea. No death events were registered.

Twelve patients were treated with scorpion antivenom and 23 patients received glucocorticoid therapy, five patients received prophylactic antibiotic therapy, as well as NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) and antihistamine therapy at the emergency unit.

## Discussion

This study reports a single-center retrospective analysis of scorpion stings in patients assisted in the Tropical Medicine Unit, in the Metropolitan Area of Buenos Aires ("AMBA")

from Spanish). Most patients were male and adults and that could explain the lack of severe envenomation cases, more frequent in children. It has been reported that *T. trivittatus* stings killed 30 children in provinces of the Center and North of Argentina between 2001 and 2012 (Martino *et al.* 2001; Piola *et al.* 2006; de Roodt 2009; de Roodt 2014). Two more cases occurred in 2012 and 2016 in Catamarca province, two young patients of 15 and 17 years old had severe scorpion sting envenomation, and one of them died (El Ancasti 2012; El Ancasti 2016).

In this study, *T. trivittatus* was the prevalent scorpion with high-density distribution in the old neighborhoods of the city, as has been already reported (Salomón and de Roodt 2000; de Roodt *et al.* 2003; 2014; Blanco *et al.* 2016). As they described, it is possible to visualize spreading route along the subway and train rails from the east old neighborhoods to the west side of the city.

Since 2003, *T. confluens* was recognized as responsible for deaths in Argentina with some fatal cases involving children in the North-western provinces of Tucuman, Catamarca and Jujuy (de Roodt 2009). *T. serrulatus*, another species of medical importance, has been occasionally captured on the Northeast of Argentina. *T. confluens* and *T. serrulatus* have not been identified in AMBA yet.

It has been observed a slight increase of scorpion envenomation reports in the last years, the same phenomenon happens at national level, while arachnoidism and ofidism reports remain stable (Figure 2 a, and b). This could be due to an increase of scorpions' activity and other environmental phenomena, such as the facultative parthenogenetic characteristic of *T. trivittatus* and the scarce of natural predators in a big city like Buenos Aires (de Roodt 2014).

Scorpions were found mostly inside the houses, in relation with warm and humid places, such as rooms, kitchens, and toilets. Specimens were found in different levels from underground up to the 9<sup>th</sup> floor, as well it was previously described (de Roodt 2014; Blanco *et al.* 2016).

In concordance with other reports, this study support there the density of *T. trivittatus* for Buenos Aires City (99% of the scorpion captures) is greater than for the surrounded belt of Buenos Aires, where coexists with *B. bonariensis* (Salomon and de Roodt 2001).

The specific antivenom anti-*Tityus trivittatus* is

produced by the National Institute for Production of Biologics, ANLIS "Dr. C. Malbrán" of the Ministry of Health of Argentina, through the immunization of horses with *Tityus trivittatus*' venom. It is freely distributed all over the country by the Ministry of Health (de Roodt 2014).

Twelve patients with mild systemic symptoms received specific antivenom. In these cases patient's anxiety and fear were mistaken as systemic symptoms, probably due to physician's little knowledge on scorpion envenomation. Mild poisoning does not require antivenom administration, it can be managed with NSAID or local lidocaine administration for pain therapy, and to calm patient's fears. In addition, some patients received inappropriate treatment (useless for scorpion sting), like glucocorticoids and antibiotic prophylaxis.

Another important issue about scorpion stings is prevention. People should receive indications to shake out shoes, clothes, and canvas; to dislodge any scorpions and to remove all trash, logs, boards, stones, bricks and other objects around the house. It should also be indicated to wear shoes and gloves when working outdoors. Place mesh underneath the grate of the drain. Also, it is possible to conduct an active search, and capture or kill the scorpions. The use of chemicals or the introduction of natural predators (cats, chickens) are other options available, although the use of chemicals is not recommended unless an order and cleaning of the environment has been previously conducted. (Ministerio de Salud de la Nación 2011; de Roodt 2014; mayoclinic.org 2016; msal.gov.ar 2018).

## Conclusions

We reported the epidemiological and clinical characteristics of scorpion poisoning attended in a single center in AMBA. This envenomation could be life threatening, nevertheless, it is treatable and preventable. In general, the findings regarding scorpion accidents are consistent with others reports. The stings occur mostly in Buenos Aires city and the most common species found was *T. trivittatus*. Most of the envenomations were mild, in contrast with the severity described in some provinces in Argentina, where death have been reported. Even the antivenom produced in our country is enough to cover the treatment demands, this series shows it could be some overuse. It is important a responsible use since the antivenom is a scarce resource difficult to obtain.

This is a retrospective study, we considered that a prospective one is needed, to focus on potential complications of scorpion envenomation and identifying early markers of severity, such as electrocardiogram changes, echocardiographic changes, serum markers of cardiac distress and others.

It is important to continue with the epidemiological surveillance on new species that could be introduced to AMBA with new clinical manifestations and severity.

## References

Asociación Toxicológica Argentina. [on line]. Tres casos de picadura de alacrán alertan al país. [Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <https://www.toxicologia.org.ar/tres-casos-picadura-alacran-alertan-al-pais/>

Blanco G., Laskowicz R., Scarlatto E., Casas N., Costa de Oliveira V., Lanari L., Lago N., de Roodt A. Increased incidence of *Tityus trivittatus*. Envenoming in the City of Buenos Aires. *Toxicon*. 2012;60(2):188.

Bortoluzzi L.R., Morini Querol M.V., Quero L.E. Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotrop*. 2007;7(3):357-359.

Boyer L.V., Theodorou A.A., Berg R.A., Joanne Mallie R.N., Chávez-Mendez A., García-Ubbelohde W., Hardiman S., Alagón A., for the Arizona Envenomation Investigators. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *N Engl J Med*. 2009;360(20):2090-2098.

Camargo F.J., Ricciardi A. Sobre la presencia de un escorpión *Tityus serrulatus* Lutz e Mello (Scorpiones, Buthidae) en la ciudad de Corrientes. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2000, UNNE, Actas; Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, 2000.

Chippaux J.P., Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop*. 2008;107(2):71-79.

de Roodt A. Escorpionismo en Argentina [on line]. Asociación Toxicológica Argentina. [Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <http://www.toxicologia.org.ar/opiniones/escorpionismo-en-argentina/>

de Roodt AR. Comments on Environmental and Sanitary Aspects of the Scorpionism by *Tityus trivittatus* in Buenos Aires City, Argentina. *Toxins (Basel)*. 2014;6(4):1434-1452.

de Roodt AR, Lanari LC, Laskowicz RD, Costa de Oliverira V. Identificación de los escorpiones de importancia médica en la Argentina. *Acta Toxicol Argent*. 2014;22(1):5-14.

de Roodt A.R. Estudio del Veneno de Algunos Escorpiones de Importancia Médica de la Argentina. Master in Science thesis, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Buenos Aires, Argentina, 2009.

de Roodt A.R., Lago N.R., Salomón O.D., Laskowicz R.D., Neder de Román L.E., López R.A., Montero T.E., del V Vega V. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*. *Toxicon*. 2009;53(1):1-8.

de Roodt A.R., García S.I., Salomón O.D., Segre L., Dolab J.A., Funes R.F., de Titto E.H. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon*. 2003;41(8):971-977.

Docampo P., Fernández M. Escorpionismo: presentación de un posible caso grave ocurrido en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Acta Toxicol Argent*. 2011,19(1):16-18.

El Ancasti. Desde hace 4 años nadie moría por picadura de alacrán. San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina. [on line]. El Ancasti 2012 October 6<sup>th</sup>. [Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <https://www.elancasti.com.ar/info-gral/2012/10/6/desde-hace-anos-nadie-moria-picadura-alacran-190188.html>.

El Ancasti. Adolescente en grave estado por la picadura de un alacrán. San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina. [on line]. El Ancasti 2016 January 20<sup>th</sup>. [Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <https://www.elancasti.com.ar/info-gral/2016/1/20/adolescente-grave-estado-picadura-alacran-285733.html>.

Isbister G.K., Bawaskar H.S. Scorpion Envenomation. *N Engl J Med*. 2014;371(5):457-463. Khatlabi A., Soulaymani-Bencheikh R., Achourb S., Salmie L., for the Scorpion Consensus Expert Group. Classification of clinical

consequences of scorpion stings: consensus Development. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(7):364-369.

Martino O., Orduna T.A., Espinosa M. Atlas de patología humana provocada por la agresión de animales. Ideográfica, 2001.

Mayo Clinic. Disease and conditions: Scorpion Sting. [on line]. Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, United States: Mayo Clinic Staff. [Updated on October 6<sup>th</sup>, 2016; Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/scorpion-stings/symptoms-causes/syc-20353859>.

Ministerio de Salud de la Nación. Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica del Envenenamiento por Escorpiones. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. Ministerio de Salud, Argentina. 2011. 40 p.

Ministerio de Salud de la Nación. Programa de Prevención y Control de Intoxicaciones. [on line]. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. [Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <http://www.msal.gov.ar/determinantes/index.php/datos/programa-nacio->

[nacional-de-prevencion-y-control-de-las-intoxicaciones](http://www.msal.gov.ar/determinantes/index.php/datos/programa-nacional-de-prevencion-y-control-de-las-intoxicaciones).

Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención de las Enfermedades Zoonóticas. Prevención ante la aparición de alacranes. [on line]. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. [Accessed: January 17<sup>th</sup>, 2018]. Available at: <http://www.msal.gov.ar/zoonosis/index.php/informacion-para-adolescentes/animales-ponzonosos-venenosos>.

Ojanguren-Affilastro A.A., Adilardi R.S., Cajade R., Ramírez M.J., Ceccarelli F.S., Mola L.M. Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). *PLoS One.* 2017,12(7):e0181337.

Piola J.C., Prada D.B., Waksman J.C., Evangelista M. Increase mortality and morbidity from *Tityus trivitattus* envenomation in Argentina. *Clin Toxicol.* 2006;44(5):650.

Salomón O.D., de Roodt A.R. Escorpiones: denuncia espontanea en dos centros de referencia en la ciudad de Buenos Aires, 1997-2000. *Medicina (Buenos Aires).* 2001;61(4):391-396.

**Validación de un método para la determinación del ácido 3-fenoxibenzoico en orina por QuEChERS, microextracción líquido-líquido dispersiva y cromatografía líquida de alta resolución-arreglo de diodos**

**Validation of a method for the determination of 3-phenoxybenzoic acid in urine using QuEChERS, microextraction liquid-liquid dispersive and high-performance liquid chromatography-diode array**

Herrero, Florencia; Rodríguez, María Soledad; Cañas, Ana Irene; Lucero, Patricia Antonia

Unidad Agroquímicos. Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR). Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba.

Recibido: 9 de enero de 2018

Aceptado: 10 de mayo de 2018

**Resumen.** Los piretroides son insecticidas ampliamente usados no sólo en el ámbito agropecuario y doméstico sino también en salud pública. Una vez absorbidos, son rápidamente metabolizados a compuestos polares eliminados por vía renal. Uno de los metabolitos común a un gran número de piretroides es el ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA) el cual es utilizado como marcador de exposición. Se presenta en este trabajo, la validación de una metodología analítica para la determinación del 3-PBA utilizando QuEChERS acoplado a microextracción líquido-líquido dispersiva con tricloroetileno como disolvente extractivo y cromatografía líquida de alta resolución con detector de foto-arreglo de diodos. La validación se realizó con muestras aisladas de orina de voluntarios adultos de ambos sexos sin exposición conocida y orina sintética. El método resultó lineal en el intervalo  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ – $79 \mu\text{g L}^{-1}$ ; los límites de detección y cuantificación fueron de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. No se observaron señales de interferentes a los tiempos de retención del 3-PBA y del ácido 2-fenoxibenzoico (2-PBA), estándar interno, en las muestras de orina blanco. Las señales cromatográficas en las muestras enriquecidas fueron espectralmente homogéneas. Las precisiones intradiarias ( $\text{RSD}_r\%$ ) ( $n=5$ ) para  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  estuvieron comprendidas entre 9,3%-9,9% y para  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  entre 5,9%-10,6%. Las precisiones interdiarias ( $\text{RSD}_{int}\%$ ) ( $n=15$ ) para los mismos niveles de concentración fueron de 11,8% y 9,1%, respectivamente. El rango de porcentajes de recuperación para  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  fue de 87%-119% y para  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  de 70%-91%. Se evaluó la estabilidad del analito en la muestra y en el extracto. El analito resultó estable a  $-20^\circ\text{C}$  durante 7 días en la muestra y durante 1 día en el extracto. Los valores de incertidumbre relativa e incertidumbre expandida fueron evaluados mediante la ecuación de Horwitz, los resultados obtenidos fueron para el nivel  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  de 33% y 65% y para el nivel  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  de 28% y 55%. La aplicabilidad del método validado fue evaluada con muestras reales de personas sin exposición laboral conocida, quienes declararon haber usado insecticidas piretroides. El método resultó sensible y selectivo.

**Palabras clave:** Validación; Ácido 3-fenoxibenzoico; Piretroides; Orina.

**Abstract.** Pyrethroid insecticides are used not only in the agricultural and domestic environment, but also in public health. Once absorbed, they are rapidly metabolized into polar compounds eliminated by the kidneys. One of the metabolites common to many pyrethroids is 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) which are used to evaluate exposure. We present in this paper the validation of an analytical methodology for the determination of 3-PBA using QuEChERS coupled to dispersive liquid-liquid microextraction with trichloroethylene as an extractive solvent and high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector. Validation was carried out with isolated samples of urine from adult volunteers of both sexes without exposure and synthetic urine. The method was linear in the interval  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ – $79 \mu\text{g L}^{-1}$ ; the limit of detection and quantitation were  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. Interfering signals were not observed in the blank urine samples and the chromatographic signals in the enriched samples were spectrally homogeneous. The within-run precision ( $\text{RSD}_r\%$ ) ( $n=5$ ) for  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  were between 9.3%-9.9% and for  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  between 5.9%-10.6%. The between-run precision ( $\text{RSD}_{int}\%$ ) ( $n=15$ ) for the same concentration levels were 11.8% and 9.1%, respectively. The recovery for  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  ranged from 87%-119% and for  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  from 70%-91%. The stability of the analyte was evaluated in the sample and in the extract. The analyte in the sample was stable at  $-20^\circ\text{C}$  for 7 days and in the extract was stable for 1 day. The values of relative uncertainty and expanded uncertainty obtained by the Horwitz equation were 33% and 65% for  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ , and 28% and 55% for  $27 \mu\text{g L}^{-1}$ . The applicability of the validated method was evaluated with real samples of people without known occupational exposure, who declared having used pyrethroid insecticides. The method was sensitive and selective.

**Keywords:** Validation; 3-phenoxybenzoic acid; Pyrethroids; Urine.

## Introducción

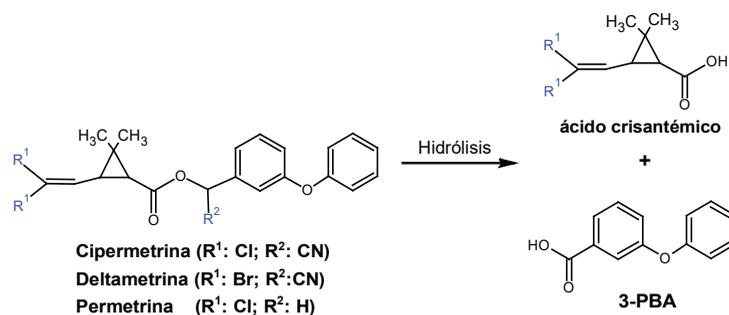
Los insecticidas piretroides se desarrollaron como análogos estructurales del insecticida natural piretrina, que se encuentra en las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Fortes y col. 2013). Los piretroides son ampliamente utilizados para controlar las plagas de insectos en agricultura y salud pública debido a su relativa seguridad para los humanos y alta potencia insecticida (Tsuji y col. 2012).

Químicamente, los piretroides son ésteres del ácido vinil ciclopropano carboxílico y un alcohol ciclopentanona, que en la mayoría de los casos es el 3-fenoxibenciloalcohol (Wielgomias y col. 2013). La mayoría de los piretroides son moléculas quirales y existen como mezclas de enantiómeros (Saillenfait y col. 2015).

El modo de acción de los piretroides en mamíferos es el mismo que en insectos, la alteración de los canales de sodio dependientes de voltaje. Estos se unen a la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio y retrasan la activación, así como la velocidad de inactivación (cierre) de este canal, lo que lleva a un estado de hiperexcitabilidad y despolarización de la membrana neuronal (Costa y col. 2008). Además de la neurotoxicidad, los piretroides, producen efectos negativos en la reproducción de mamíferos, son inmunotóxicos y se ha informado que probablemente sean cancerígenos para los humanos (Trunnelle y col. 2014).

La población general se encuentra potencialmente expuesta a piretroides principalmente a través del consumo de alimentos, pero la exposición también podría ocurrir por inhalación y absorción dérmica, especialmente después del uso doméstico de estos plaguicidas (Fortin y col. 2008). Se ha reportado la exposición ocupacional de trabajadores en plantas de producción de formulados de plaguicidas y de aplicadores durante las operaciones de control de plagas (Saillenfait y col. 2015).

Una vez absorbidos, los piretroides son rápidamente metabolizados por escisión hidrolítica del enlace éster a compuestos polares y eliminados por vía renal. La presencia de metabolitos en la orina refleja exposición reciente. La fracción alcohol del grupo de piretroides que incluye permetrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, lambda-cialotrina, fenotrina, cifenotrina, fluvalinato y tralometrina se metaboliza a ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA) (Figura 1).



**Figura 1.** Hidrólisis de piretroides a ácido crisantémico y ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA).

Este ácido forma conjugados principalmente con ácido glucurónico para poder ser eliminado por orina (Bartosz y col. 2014). Este metabolito urinario es un biomarcador genérico y útil para evaluar exposición humana a piretroides (Chuang y col. 2011; Gloennec y col. 2017).

Schettgen y col. (2016), en un estudio piloto, analizaron muestras de orina de 38 personas de la población general para investigar posibles niveles basales de 8 biomarcadores de exposición a piretroides. Detectaron en todas las muestras cantidades cuantificables de 3-PBA, con un valor promedio de  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$  siendo el valor máximo encontrado de  $3,98 \mu\text{g L}^{-1}$ . En otro trabajo, en el cual se analizaron 305 muestras de orina de niñas de entre 9 y 15 años, se detectaron en 270 muestras concentraciones de 3-PBA en el rango de  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $28,16 \mu\text{g L}^{-1}$  (Ye y col. 2017).

En Argentina no existen datos sobre niveles de biomarcadores de exposición a insecticidas piretroides. Por ello, sería conveniente contar con métodos analíticos para la determinación de 3-PBA y otros metabolitos de piretroides en orina suficientemente sensibles para evaluar la exposición a estas sustancias, dado su extendido uso.

Los biomarcadores de exposición a plaguicidas pueden estar presentes en la población general en concentraciones de pocos  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y en consecuencia su determinación requiere métodos analíticos sensibles y selectivos. Los métodos analíticos instrumentales desarrollados para determinar metabolitos de piretroides en orina se pueden dividir en: (a) métodos por cromatografía gaseosa, con detectores de captura de electrones o espectrometría de masas (Lin y col. 2011; Saito y col. 2014); (b) métodos por cromatografía líquida de alta resolu-

ción (HPLC), con detector de absorbancia ultravioleta (Smith y col. 2002) o foto-arreglo de diodos (PDA) (Kumar y col. 2011; Wielgomas y col. 2013); y (c) ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Ahn y col. 2011; Chuang y col. 2011). Hoy en día, la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem se ha convertido en la técnica analítica utilizada con mayor frecuencia para el biomonitorio de plaguicidas en orina (Roca y col. 2014).

La preparación de la muestra es un paso clave del método analítico y se deben emplear procedimientos adecuados de extracción, limpieza del extracto y preconcentración. La técnica de extracción líquido-líquido (LLE) se ha utilizado en forma rutinaria durante muchos años, pero debido a que consume tiempo y demanda grandes cantidades de solvente, ha sido desplazada por técnicas miniaturizadas (Martínez Vidal y col. 2009; Boyd Barr y col. 2010; Tao y col. 2013). La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) permite la extracción y concentración simultánea de los analitos. Se fundamenta en el uso de un sistema ternario de solventes (la fase acuosa y una mezcla de dos solventes orgánicos) uno miscible con el agua, que funciona como agente dispersante, y otro inmiscible con agua y miscible con el agente dispersante, llamado agente extractante. Las 3 fases forman una emulsión, que incrementa al máximo la superficie de contacto entre ellas, favoreciendo así la rápida transición del analito entre la muestra y el extractante (Mudiam y col. 2014). Las principales ventajas de estas técnicas son simplicidad de operación, rapidez, bajo costo, fácil manejo, bajo consumo de solventes orgánicos, alta recuperación, alto factor de enriquecimiento y compatibilidad con cromatografía líquida y gaseosa (Bolzan y col. 2015).

La técnica QuEChERS (acrónimo inglés de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe* [rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro]) es muy flexible ya que puede ser modificada en función de las propiedades del analito, de la composición de la matriz y del equipamiento disponible. El procedimiento QuEChERS implica una extracción con acetonitrilo y una etapa de extracción/partición luego de la adición de una mezcla de sales (Lehotaya y col. 2010). Tradicionalmente es utilizada en la determinación de plaguicidas y sus metabolitos en alimentos, ya que resulta una técnica apropiada para la extracción y limpieza de matrices complejas y análisis simultáneo de múltiples analitos (Li y col. 2016). Esta técnica

ha sido empleada para el análisis de biomarcadores de exposición a plaguicidas en orina humana (Roca y col. 2014).

El objetivo de este trabajo fue la validación de una metodología analítica usando QuEChERS, DLLME y HPLC con detector PDA para la determinación de 3-PBA en orina.

## Materiales y métodos

### Muestra biológica

Para la validación del método se colectaron muestras aisladas de orina de voluntarios adultos, de ambos sexos y sin exposición conocida laboral a insecticidas piretroides (orinas blanco, OB). Sin embargo, puesto que el principio activo de la mayoría de los insecticidas de uso doméstico es un piretroide o una mezcla de piretroides, fue difícil obtener muestras de orina blanco. Se hizo un procedimiento de selección para determinar que muestras de orina contenían concentraciones no detectables de 3-PBA. De 20 orinas analizadas se seleccionaron 6 que no tenían niveles detectables de 3-PBA para evaluar la selectividad. Por este motivo, para determinar algunos parámetros de la validación se utilizó una orina sintética (OS) preparada en el laboratorio (B'Hymer 2011; Ye y col. 2017).

### Estándares y reactivos

Los estándares de 3-PBA y 2-PBA de pureza certificada (98%) fueron provistos por Sigma Aldrich. Para la preparación de la fase móvil y el tratamiento de las muestras se utilizaron los siguientes reactivos: acetonitrilo (Sintorgan, grado HPLC), ácido acético (Merck, EMSURE®); tricloroetileno, cloruro de sodio y ácido clorhídrico (Cicarelli, grado Pro-análisis); tiras reactivas de orina (Wiener Lab.) y tiras de pH (Merck). Se empleó agua calidad HPLC obtenida mediante el sistema Milli-Q Plus®. Para la técnica de QuEChERS se utilizó para cada muestra: sulfato de magnesio anhidro (8 g) (Merck, ENSURE®), cloruro de sodio (2 g) (Cicarelli, pro-análisis), citrato de sodio (2,14 g) (Sigma-Aldrich, ACS®), citrato de sodio sesquihidratado (1 g) (Sigma Aldrich, Plus®).

Los reactivos necesarios para preparar un litro de orina sintética fueron: cloruro de potasio (3,80 g), cloruro de sodio (8,53 g), urea (24,5 g), sulfato de magnesio (1,03 g), fosfato de potasio (1,18 g), hidróxido de sodio (0,64 g), bicarbonato de sodio (0,47 g), todos marca Cicarelli, grado pro-análisis; ácido sulfúrico (0,496 g) (Merck, pro-análisis), ácido cítrico (1,03 g) (Sigma-Aldrich, ACS®), ácido ascórbico (0,34 g) (Sigma-Aldrich, BioXtra), crea-

tinina (1,40 g) (PUREST) y agua calidad HPLC (Milli-Q Plus®) (Gustafsson y Uzqueda 1978).

#### Equipamiento

Se empleó un Cromatógrafo Líquido Alliance 2690 Waters con detector de foto-arreglo de diodos (PDA) 996 Waters y sistema automático de registro de datos. El software utilizado para adquisición de los datos fue Empower 2 TM de Waters (Waters Corporation 2005). Se utilizaron balanzas analíticas Shimadzu-Modelo AUW220D-Legibilidad 0,01 mg y Shimadzu Libror AEG-220-Legibilidad 10 mg.

#### Preparación de las soluciones patrones

Las soluciones stock de 3-PBA y 2-PBA se prepararon pesando como mínimo 10 mg (legibilidad 0,01 mg) del estándar y llevando a volumen con metanol. A partir de estas soluciones se prepararon por dilución las soluciones intermedias y de trabajo. Todas las soluciones fueron conservadas en frascos de vidrio y se almacenaron a -20 °C hasta la fecha de vencimiento.

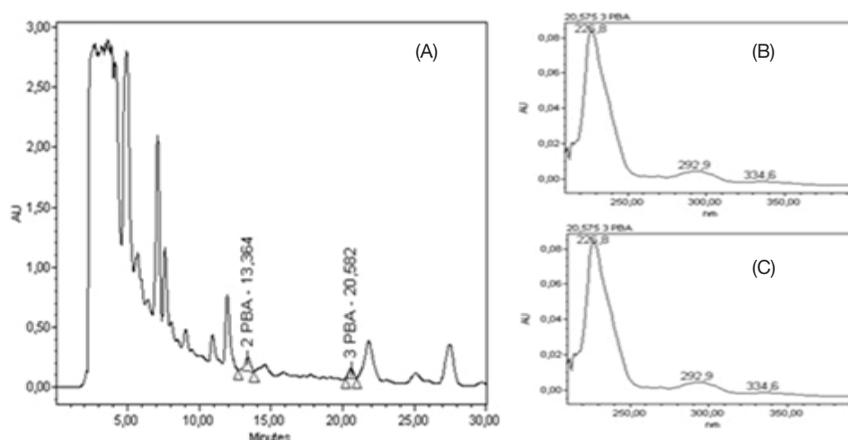
#### Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente con una columna ZORBAX Eclipse® XDB-C18, (250 x 4,6 mm) 5-Micron (Agilent) y guarda columna XDB-C18 Guard (5 µm, 0,5 x 35 mm) (Agilent). Se empleó una fase móvil constituida por: 60% de solución acuosa de ácido acético al 1% y 40% de acetonitrilo acidificado al 1% con ácido acético, a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El volumen de inyección fue 40 µL. Se hizo un barrido espectral entre 210-400 nm y se cuantificó a 230 nm. En estas condiciones los tiempos de retención (en minutos) fueron 13,4 para el 2-PBA (estándar

interno) y 20,7 para el 3-PBA (Figura 2).

#### Tratamiento de las muestras

Se realizó el análisis físico-químico de las muestras de orina con tiras reactivas. Se adicionaron a 10 mL de cada muestra, cantidad suficiente del estándar interno (EI) en metanol para obtener una concentración final de 0,1 µg mL<sup>-1</sup>. Para liberar el 3-PBA de los conjugados, se procedió a una hidrólisis ácida añadiendo 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentando en estufa a 90 °C durante 1 hora. Cada muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de la hidrólisis, se realizaron las extracciones por el método QuEChERS con acetonitrilo para extraer el 3-PBA y el EI de las muestras. Una alícuota del extracto de acetonitrilo se usó para la DLLME como disolvente dispersivo y tricloroetileno como disolvente extractivo para aumentar el factor de enriquecimiento del procedimiento de extracción. Brevemente, en un tubo de polipropileno de 50 mL se colocaron la orina hidrolizada junto con las sales de QuEChERS y 10 mL de acetonitrilo. Se agitaron vigorosamente por 1 minuto y se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm. Se tomaron 9,5 mL de extracto de acetonitrilo y se le agregaron 20 mL de agua desionizada, 0,5 g de cloruro de sodio y 200 µL de ácido clorhídrico concentrado. A continuación, se adicionaron rápidamente con pipeta automática 1 mL de tricloroetileno, con posterior agitación en un agitador orbital durante 1 minuto y se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm. El extractante (tricloroetileno) fue separado y se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno en baño de agua a 50 °C. Por último, el residuo se reconstituyó en 60 µL de fase móvil.



**Figura 2.** (A) Ejemplo del perfil cromatográfico de una muestra de control de calidad (MCC). (B) Espectro de absorbancia característico del 2-PBA (ácido 2-fenoxibenzoico). (C) Espectro de absorbancia característico del 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico).

### Validación

Los parámetros evaluados durante la validación fueron: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, precisión, veracidad, arrastre (*carry-over*), estabilidad del analito en la muestra y en el extracto e incertidumbre.

### Linealidad

La linealidad fue evaluada analizando 5 estándares de calibración (EC) de concentraciones de 3-PBA en el rango de  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $79 \mu\text{g L}^{-1}$ ; una muestra blanco (muestra sin analito y sin EI) y una muestra cero (muestra con EI). Los EC se prepararon diariamente adicionando, a 40 mL de OB y OS, alícuotas de las soluciones de trabajo de 3-PBA y 2-PBA en metanol respectivamente. Cada nivel de concentración se realizó por duplicado. La curva de calibración se construyó graficando la relación de las alturas 3-PBA/2-PBA versus la concentración nominal del analito. Se realizó un análisis de regresión lineal de los datos, que proporcionó una pendiente y una ordenada al origen. La linealidad se evaluó empleando las propuestas de la ISO 8466-1 (International Standard Organization 1990): (1) la representación gráfica de los datos con la recta de regresión lineal calculada y (2) test estadístico: se calcula el valor PG requerido para la prueba F. Si  $PG \leq F$  la función de calibración no lineal no da lugar a una mejora significativa del ajuste y por lo tanto la función de calibración es lineal. Se comparó la pendiente de las curvas de calibración generadas en orina humana y orina sintética por análisis de regresión lineal con variables auxiliares (Guerra Simones y col. 2007).

### Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) se definió como la concentración más baja a la que se cumplen los criterios cualitativos (tiempo de retención y espectro UV-Visible) al menos en el 90% de casos. Se analizaron 5 muestras de control de calidad (MCC) en OS enriquecidas a la concentración del LD. El límite de cuantificación (LC) es el punto de menor concentración en la curva de calibrado en ambas matrices (Da Costa y Chasin 2004; EMA 2011).

### Selectividad

Para la evaluación de posibles interferentes endógenos de la matriz, se analizaron 6 muestras de orina previamente seleccionadas y alícuotas de estas muestras enriquecidas con

3-PBA en el LC. Una señal se consideró interferente si es mayor que el 20% del LC del 3-PBA y mayor que el 5% del EI. Se determinó, además, la homogeneidad espectral de la señal del analito y el EI en las muestras enriquecidas a partir de las curvas de similitud y umbral de pureza (EMA 2011).

### Arrastre (*carry-over*)

Se evaluó inyectando extractos de OB y OS después de un EC o MCC de concentración elevada. Las señales de los analitos en la muestra blanco no deben ser mayores que el 20% del LC del 3-PBA y el 5% del EI (EMA 2011).

### Precisión

Se evaluó la precisión del método en términos de repetibilidad (precisión intradiaria) y precisión intermedia (precisión interdiaria) y fue expresada como el porcentaje de la Desviación Estándar Relativa (RSD%). Se utilizaron MCC en OS de 2 niveles de concentración:  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $27 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para la precisión intradiaria (RSDr%) se analizaron 5 réplicas por nivel de concentración. La precisión interdiaria (RSDint%) se evaluó analizando 5 réplicas de cada nivel en diferentes días y por diferentes analistas. El RSD% no debe exceder el 15%, excepto en el LC en el que es aceptable un RSD% de hasta 20% (EMA 2011).

### Veracidad

La veracidad del método se evaluó mediante un ensayo de adición/recuperación. Las recuperaciones se calcularon a partir de los datos obtenidos durante la evaluación de la precisión. Las MCC se enriquecieron en forma independiente de los EC utilizando soluciones preparadas por separado. Las MCC se cuantificaron con curva de calibración y las concentraciones obtenidas se compararon con el valor nominal. Los valores de recuperación aceptables se encuentran dentro del rango 70%-125% (AOAC 2002).

### Estabilidad

Se evaluó la estabilidad del analito en MCC de concentración  $27 \mu\text{g L}^{-1}$  en OB y OS durante 3 etapas relevantes del desarrollo de la metodología. Alícuotas de las MCC de OB se conservaron en las siguientes condiciones:  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 días y  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 60 días. Las muestras se analizaron por duplicado frente a curvas de calibración recientemente preparadas, y las concentraciones obtenidas se compararon con la concentración nominal.

Se evaluó estabilidad del analito frente a las condiciones de la hidrólisis en 6 alícuotas de MCC de OS. De las alícuotas, 3 se sometieron al proceso completo y en las 3 restantes se eliminó la hidrólisis.

La estabilidad del analito en el extracto con MCC de OB y OS se evaluó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 y 48 horas.

Se realizó, para las muestras en las 3 condiciones, análisis de la varianza de una vía (ANAVA) con la prueba DGC de comparación de medias. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

#### *Estimación de la incertidumbre de la medición*

La estimación de la incertidumbre de la medición (IM) es un parámetro asociado al resultado de la medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurado. Esta estimación se realizó utilizando la ecuación de Horwitz:  $[u' = 21 - 0,5 \log c]$ ; donde  $u'$  designa la desviación estándar relativa de la reproducibilidad y  $c$  la concentración del analito en  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La IM relativa expandida,  $U'$  (al nivel de confianza del 95%) se calculó mediante:  $U' = 2 u'$ . Los valores obtenidos a partir de la ecuación de Horwitz se consideraron como indicadores de la posible incertidumbre asociada con los resultados del ensayo debido a la falta de datos de apoyo (materiales de referencia, participación en interlaboratorios) (Codex Alimentarius, 2006).

#### *Análisis de muestras reales*

Para la verificación del método desarrollado, se procesaron 8 muestras de orinas de micción espontánea de 4 voluntarios, sin exposición laboral. Se recolectaron 4 muestras en el periodo diciembre-marzo, época de uso frecuente de insecticidas domésticos. Los voluntarios declararon haber usado productos insecticidas piretroides dentro de los 5 días anteriores a la toma de muestra. Muestras de las mismas personas fueron analizadas en época de temperaturas más bajas y menor uso de insecticidas domésticos, estación junio-agosto. Las muestras fueron analizadas en el mismo día de la recolección. La cuantificación del 3-PBA se realizó por el método de adición de estándares.

#### *Análisis estadístico*

El análisis estadístico de los datos se realizó con el *software* estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo y col. 2016).

## **Resultados y discusión**

En humanos, el proceso de transformación de los piretroides produce metabolitos urinarios que son adecuados para el monitoreo biológico. La excreción es rápida, por lo que los niveles urinarios sólo reflejan una exposición reciente. Actualmente, para propósitos de biomonitoreo sólo se usa orina como material biológico para el estudio (Wielgomas y col. 2013). El 3-PBA es un metabolito común de cipermetrina, deltametrina, permetrina, cialotrina y fenvalerato y posiblemente otros insecticidas piretroides. Por lo tanto, la detección de este metabolito en la orina puede reflejar múltiples fuentes de exposición ambiental a diferentes insecticidas piretroides (Fortes y col. 2013).

#### *Optimización de la metodología analítica*

En general, la determinación de metabolitos de piretroides en orina comprende 3 etapas: (1) hidrólisis de los conjugados; (2) extracción del metabolito libre, concentración y derivatización y (3) detección y cuantificación (Ueyama y col. 2009). La hidrólisis de los conjugados puede realizarse por métodos enzimáticos ( $\beta$ -glucuronidasa, sulfatasa) o químicos (ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y calor). Se decidió realizar una hidrólisis ácida (ácido clorhídrico /  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 1 h), también empleada por otros autores (Wang y col. 2007; Wielgomas y col. 2013; Schettgen y col. 2016). Toshima y col. (2015) compararon diferentes pretratamientos de la orina para el biomonitoreo de piretroides. Observaron un valor más bajo del metabolito en el análisis precedido por la desconjugación enzimática que en el precedido por hidrólisis ácida. Probablemente esto se deba a la presencia de otros conjugados no hidrolizados por glucuronidasas y sulfatasas.

Con la intención de obtener óptima sensibilidad se evaluaron distintas variantes de DLLME (con solvente orgánicos y líquidos iónicos), y método QuEChERS para extraer y concentrar el 3-PBA. Se encontró que el procedimiento QuEChERS simplificado propuesto por Roca y col. (2014) era apropiado para la extracción del 3-PBA de las muestras de orina. Sin embargo, no se alcanzó un LD adecuado para el biomonitoreo de la exposición a piretroides. Por ello, se decidió combinar QuEChERS y DLLME, de tal forma que el 3-PBA fue extraído de la orina por partición con acetonitrilo y luego concentrado en tricloroetileno por un procedimiento de microextracción dispersiva. Esta estrategia ha sido empleada por otros autores para de-

terminar residuos de plaguicidas en alimentos (Ravelo-Pérez y col. 2009, Melo y col. 2012). Durante el proceso de optimización de la separación cromatográfica fueron probados diferentes fases móviles, gradientes, flujos, fases estacionarias de columna, etc., para lograr una buena separación y definición de los picos del 3-PBA y del 2-PBA. Finalmente, se seleccionaron las condiciones presentadas en materiales y métodos.

Se cuantificó con estándar interno contra patrones en matriz (unipuntual o multipuntual) o por adición de estándar (EMA, 2011).

### Validación intralaboratorio

#### Linealidad

En el curso de la validación se realizaron 5 curvas de calibración. No se observaron desviaciones de la linealidad en la representación gráfica de los datos de la calibración (Figura 3). Comparando el valor calculado de PG con el valor tabulado de la distribución de Fisher-Snedecor, F (1, N-3 grados de libertad, nivel de confianza 0,95), resultó  $PG < F$  en todos los casos y por lo tanto el modelo lineal fue adecuado para modelar los datos de calibración en el intervalo de  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $79 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tabla 1). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en las pendientes de las curvas, especialmente entre curvas realizadas con OB. Esta diferencia refleja la naturaleza variable de la matriz orina. Debido a que no es posible conservar inalteradas las muestras de orina por mucho tiempo, las curvas se realizaron con OB frescas de distintos voluntarios.

#### Límite de detección y límite de cuantificación

El LC corresponde al punto más bajo de la curva de calibración:  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  (ver Precisión y Veracidad). La concentración más baja que generó una señal cromatográfica en todas las MCC y el espectro de absorción característico de los analitos fue  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ , considerado LD. Tal como han informado otros autores se detectó la presencia de 3-PBA en la mayoría de las muestras de orina analizadas (Wei y col. 2012; Le Grand y col. 2012; Morgan y col. 2016). Por esta razón, el LD se determinó empleando MCC preparadas con OS. B'Hymer (2011) empleó orinas sintéticas durante la validación de un método analítico para determinar metabolitos de tolueno y benceno en orina. Garí y col. (2018) usaron orinas sintéticas para determinar el LD y la selectividad del método analítico desarrollado para determinar 3-PBA. A diferencia de B'Hymer (2011) y Garí y col. (2018) que utilizaron orinas sintéticas comerciales, en nuestro trabajo empleamos orinas sintéticas preparadas en el laboratorio siguiendo el protocolo propuesto por Gustafsson y Uzqued (1978). El LD obtenido es comparable al informado por Wielgomas Bartzosz y col. (2014). Estos autores desarrollaron un método que combina microextracción soportada por fibra hueca y HPLC-DAD para determinar 3-PBA en orina y reportaron un LD de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . Cabe destacar que los métodos analíticos que emplean cromatografía acoplada a espectrometría de masas (CG-MS o HPLC-MSMS) permiten alcanzar LD más bajos. Ueyama y col. (2009) informan un LD de  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  con un método que mide 3-PBA por CG-MS.

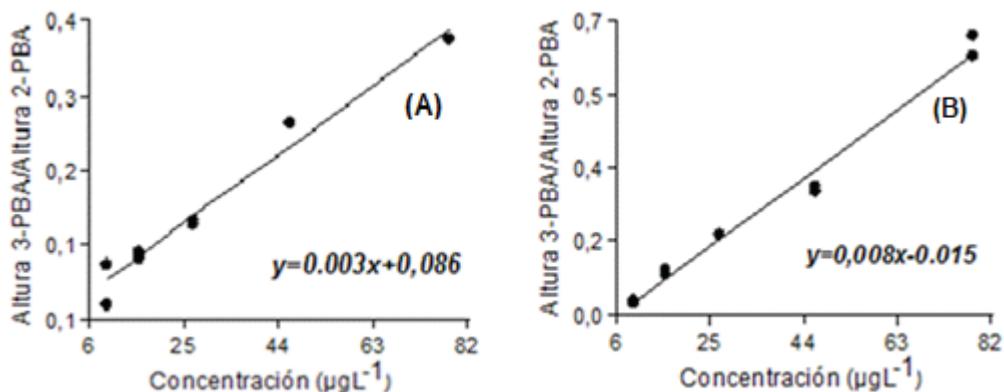


Figura 3. Ejemplos de curvas de calibración de 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico) en orina humana (A) y orina sintética (B) en el rango  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $79 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Datos de las curvas de calibración del 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico) en orina humana y orina sintética en el rango  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $79 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Matriz	a	b	PG	F	N
Orina humana	0,003	0,086	5,06		
	0,006	0,146	4,28		
Orina sintética	0,008	-0,015	0,66	18,51	5
	0,005	0,180	1,21		
	0,007	0,232	1,08		

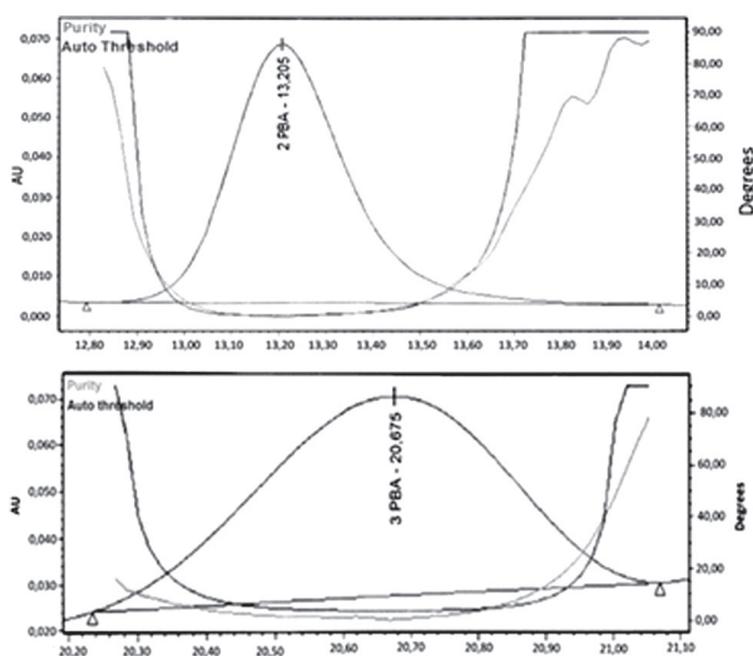
Nota: a: pendiente; b: ordenada al origen; PG: valor requerido para el test F; F= F tabulado (1, N-3), nivel de confianza 0,95; N: niveles de concentración.

Si bien no hay datos publicados sobre los niveles de exposición a insecticidas piretroides en Argentina los valores informados para otras poblaciones indican que los LD y LC del método validado son adecuados para el biomonitoreo de la exposición a piretroides. Por ejemplo, las concentraciones urinarias de 3-PBA en trabajadores textiles del este de China estuvieron en el rango de  $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$ – $261 \mu\text{g L}^{-1}$  (Lu y col. 2013). En un estudio realizado en USA que evaluó la exposición a piretroides de las familias de trabajadores rurales se detectó

3-PBA en el 80% de las 250 muestras de orina analizadas en un rango de  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ – $13 \mu\text{g L}^{-1}$  (Trunnelle y col. 2014).

#### Selectividad

No se observaron señales de interferentes en las OB, en los tiempos de retención del analito y del EI. En las muestras enriquecidas las señales del 3-PBA y 2-PBA resultaron espectralmente homogéneas, es decir la curva de similitud estuvo siempre por debajo de la curva del umbral de pureza tal como se muestra en la *Figura 4*.



**Figura 4.** Curvas de similitud y umbral de pureza de muestras enriquecidas.

**Arrastre (carry-over)**

No se observaron señales en los tiempos de retención de los analitos en la OB inyectada después de un EC de  $133 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  para el 3-PBA y el EI respectivamente.

**Precisión y veracidad**

Los resultados para la precisión y veracidad se presentan en la *Tabla 2*. Los datos muestran que el método cumple con los criterios de aceptación.

**Tabla 2.** Valores de reproducibilidad, precisión intermedia y recuperación del método.

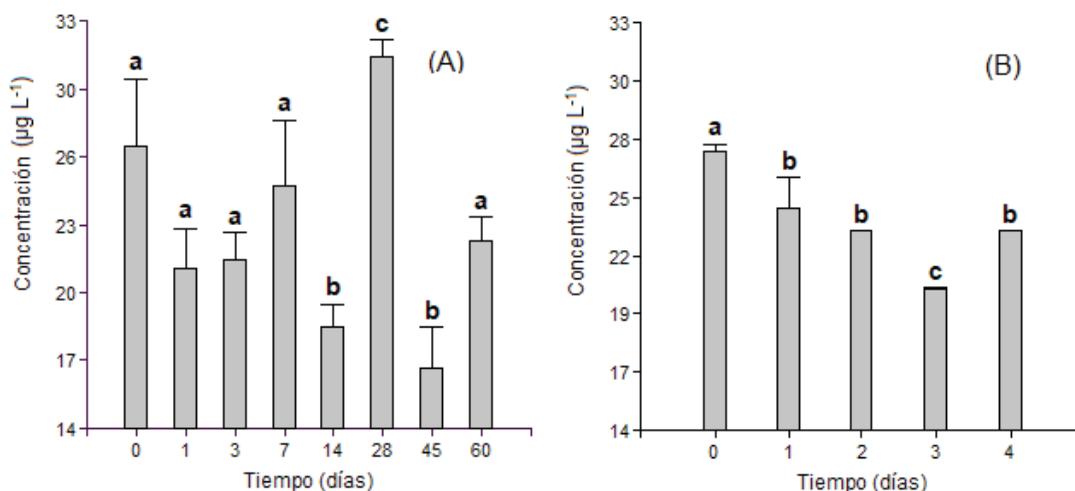
Valor Nominal	Precisión			Veracidad
	Media <sup>(a)</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSDr (%)	RSDint (%)	% Recuperación
9 $\mu\text{g L}^{-1}$	8	9,3-9,9	11,8	87 - 119
27 $\mu\text{g L}^{-1}$	21	5,9-10,6	9,1	70 - 91

<sup>(a)</sup> Valor promedio de 15 réplicas

**Estabilidad**

Como se muestra en la *Figura 5* los resultados para las muestras conservadas a  $-20^\circ\text{C}$  no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de datos hasta el día 7. Las muestras conservadas a  $4^\circ\text{C}$  se analizaron sólo durante 4 días ya que a partir del día 1 se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, las mues-

tras de orina para la determinación del 3-PBA pueden conservarse hasta 7 días a  $-20^\circ\text{C}$  sin conservantes. Estos resultados difieren de los informados por Leng y Gries (2005) que conservaron las muestras de orina durante un año a  $-20^\circ\text{C}$ . En cambio, Yoshida, (2017) reporta que las muestras de orina pueden ser conservadas durante un mes a  $-20^\circ\text{C}$ .



**Figura 5.** Estabilidad del 3-PBA (ácido 3-fenoxibenzoico) en muestras de orina a  $-20^\circ\text{C}$  (A) y  $4^\circ\text{C}$  (B). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre medias ( $p < 0,05$ ) mientras que la línea vertical muestra la desviación estándar.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de 3-PBA en las MCC con y sin hidrólisis. Esto nos permite sugerir que los patrones del analito no sufren modificaciones durante la hidrólisis ácida.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aprea y col. (1997).

Los resultados de los extractos procedentes de OB y OS conservados a  $-20^\circ\text{C}$  no mostraron diferencias estadísticamente significativas

hasta las 24 horas en la OB y hasta las 48 horas en la OS.

Complementariamente se evaluó en OB la interrupción por 24 horas de la técnica en 2 etapas del proceso: luego de la hidrólisis y luego de la extracción con QuEChERS. El proceso puede ser interrumpido luego de la hidrólisis, conservando la muestra por 24 horas a 4 °C ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, la interrupción luego de la extracción con acetonitrilo produjo diferencias estadísticamente significativas en los resultados, esto sugiere que el proceso de extracción y limpieza sólo puede ser detenido luego de la hidrólisis sin alterar los resultados.

#### *Estimación de la incertidumbre de la medición*

La estimación de la IM se realizó en dos niveles de concentración:  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $27 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores de  $u'$  y  $U'$  obtenidos fueron; 33% y 65% para el nivel  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  y 28% y 55% para el nivel  $27 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Borello y col. (2017) estimaron la incertidumbre de un método para medir 2,4-D en orina por este mismo procedimiento.

#### *Análisis de muestras reales*

En el grupo de muestras analizadas en época de uso frecuente de insecticidas domésticos se detectó 3-PBA en 3 de 4 muestras en el rango de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ - $16 \mu\text{g L}^{-1}$ . En las muestras analizadas en época de temperaturas más bajas y menor uso de insecticidas domésticos, no se detectó la presencia del metabolito en ninguna muestra. Estos datos sugieren que la frecuencia de uso de plaguicidas asociado a la época del año podría influir en la presencia del 3-PBA en orina. Otros autores observaron variaciones de los metabolitos urinarios asociadas a las estaciones; así, Attfield y col. (2014) informaron que las mediciones repetidas de metabolitos urinarios de piretroides en niños exhibieron una mayor variabilidad interpersonal que intrapersonal en verano e invierno. En otro estudio similar se detectaron los valores más altos de metabolitos de piretroides en las muestras tomadas en invierno y otoño (Lu y col. 2009).

#### **Conclusión**

El método analítico propuesto, en el que se combinaron las técnicas de extracción y concentración QuEChERS, DLLME y detección HPLC-PDA, resultó adecuado para la cuantificación del metabolito 3-PBA en orina. Esta metodología permitió obtener límites de detección y cuantificación aceptables, muy buena

reproducibilidad, recuperación y selectividad óptima. Es lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentración evaluado cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros. Como posible mejora al método se plantea estimar nuevamente la estabilidad del analito en la muestra aplicando conservantes y menores temperaturas.

Se detectaron concentraciones de 3-PBA en muestras reales de voluntarios sin exposición laboral, estos hallazgos ponen en evidencia la posible relación entre la frecuencia de uso según la época del año y la exposición a estos plaguicidas, asimismo, este dato confirma la utilidad del método tanto para biomonitorio laboral como doméstico.

#### **Bibliografía citada**

Ahn K.C., Gee S.J., Kim H.J., Aronov P.A., Vega H., Krieger R.I., Hammock B.D. Immunochemical analysis of 3-phenoxybenzoic acid, a biomarker of forestry worker exposure to pyrethroid insecticides. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(4):1285–1293.

Apra C., Stridori A., Sciarra G. Analytical method for the determination of urinary 3-phenoxybenzoic acid in subjects occupationally exposed to pyrethroid insecticides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1997;695(2):227-236.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. *AOAC Int.* 2002;1219:1–38.

Attfield K.R., Hughes M.D., Spengler J.D., Lu C. Within-and between-child variation in repeated urinary pesticide metabolite measurements over a 1-year period. *Environmental Health Perspectives.* 2014;122(2): 201-206.

Bartosz W., Marcin W., Wojciech C. Development of hollow fiber-supported liquid-phase microextraction and HPLC-DAD method for the determination of pyrethroid metabolites in human and rat urine. *Biomed Chromatogr.* 2014;28(5):708–16.

B'Hymer C. Validation of an HPLC-MS-MS method for the determination of urinary S-benzylmercapturic acid and S-phenylmercapturic acid. *J Chromatogr Sci.* 2011;49(7):547–53.

Bolzan C.M., Caldas S.S., Guimarães B.S., Primel E.G. Dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of triazine, neonicotinoid, triazole and imidazolinone pesticides in mineral water samples. *J Braz Chem Soc.* 2015;26(9):1902–1913.

Borello J.S., Cañas A. I., Lucero P.A. Validación de la metodología analítica basada en microextracción dispersiva líquido-líquido combinada con cromatografía líquida para la determinación del ácido diclorofenoxiacético en orina. *Toxicología.* 2017; 34:130-135.

Boyd Barr D., Olsson A.O., Wong L.Y., Udunka S., Baker S.E., Whitehead R.D., Magsumbol M. S., Williams B. L., Needham L. L. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general u.s. population: National health and nutrition examination survey 1999-2002. *Environ Health Perspect.* 2010;118(6):742–748.

Chuang J.C., Van Emon J.M., Trejo R.M., Durnford J. Biological monitoring of 3-phenoxybenzoic acid in urine by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Talanta.* 2011;83(5):1317–1323. Costa L.G., Giordano G., Guizzetti M., Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci.* 2008;13:1240–1249.

Da Costa J.L., Chasin da Matta A.A. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B.* 2004;811(1):41–45.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2016. [consulta 26 de julio 2017]. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

Fortes C., Mastroeni S., Pilla M.A., Antonelli G., Lunghini L., Aprea C. The relation between dietary habits and urinary levels of 3-phenoxybenzoic acid, a pyrethroid metabolite. *Food Chem Toxicol.* 2013;52(2):91–96.

Fortin M.C., Bouchard M., Carrier G., Dumas P. Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environ Res.* 2008;107(3):343–350.

Garí M., González-Quinteiro Y., Bravo N., Grimalt J.O. Analysis of metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides in human urine from urban and agricultural populations (Catalonia and Galicia). *Science of the Total Environment.* 2018;622:526-533.

Glorennec P., Serrano T., Fravallo M., Warembourg C., Monfort C., Cordier S., Viel J.-F., Le Gléau F., Le Bot B.; Chevrier C. Determinants of children's exposure to pyrethroid insecticides in western France. *Environ Int.* 2017;104:76–82.

Guerra Simones N., Vale Caedoso V., Ferrerira E., Benoliel, M.J., Almeida C.M. Experimental and statistical validation of SPME-GC-MS analysis of phenol and chlorophenols in raw and treated water. *Chemosphere.* 2007;68(3):501–510.

Guideline on bioanalytical method validation (EMA). EMEA, Comm Med Prod Hum Use. 2011;44:1–23. Gustafsson J.B.C., Uzqueda B.H.R. The influence of citrate and phosphate on the Mancini single radial immunodiffusion technique and suggested improvements for the determination of urinary albumin. *Clin Chim Acta.* 1978;90(3):249–257.

Kumar B., Kumar S., Prakash D., Singh S.K., Mishra M., Jain P.K., Gaur R., Goel G., Sharma C.S., Kamayotra J.S., Gautam S.P. Determination of pyrethroid insecticides by reversed phase high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) with different types of column. *Proc Indian Natn Sci Acad.* 2011;77(1):51–55.

Le Grand R., Dulaurent S., Gaulier J.M., Saint-Marcoux F., Moesch C., Lachatré G.. Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. *Toxicology Letters.* 2012;210(2):248-253.

Lehotaya S.J., Ae Son K., Kwon H., Koesukkiwat U., Fu W., Mastovska K., Hohe E., Leepipatpiboon N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A.* 2010;1217(16):2548–2560.

Leng G., Gries W. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography–high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005;814(2): 285-294.

Li W., Morgan M.K., Graham S.E., Starr J.M. Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method. *Talanta*. 2016;151:42–50.

Lin C.H., Yan C.T., Kumar P.V., Li H.P., Jen J.F. Determination of pyrethroid metabolites in human urine using liquid phase microextraction coupled in-syringe derivatization followed by gas chromatography/electron capture detection. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(3):927–37.

Lu C., Barr D.B., Pearson M.A., Walker L.A., Bravo R. The attribution of urban and suburban children's exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a longitudinal assessment. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2009;19(1):69-78.

Lu D., Wang D., Feng C., Jin Y.E., Zhou Z., Wu C., Lin Y., Wang G. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in textile workers, Eastern China. *Environment international*. 2013;60:137-144.

Martínez Vidal J.L., Plaza-Bolaños P., Romero-González R., Garrido Frenich A. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *J Chromatogr A*. 2009;1216(40):6767–88.

Melo A., Cunha S.C., Mansilha C., Aguiar A., Pinho O., Ferreira I. M. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Food chemistry*. 2012;135(3):1071-1077.

Morgan M., Jones P., Sobus J., Boyd Barr D. Predictors of Urinary 3-Phenoxybenzoic Acid Levels in 50 North Carolina Adults. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(11):1172-1180.

Mudiam M.K.R., Chauhan A., Jain R., Dhuriya Y.K., Saxena P.N., Khanna V.K. Molecularly im-

printed polymer coupled with dispersive liquid–liquid microextraction and injector port silylation: a novel approach for the determination of 3-phenoxybenzoic acid in complex biological samples using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2014;945:23–30.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). [en línea.]. Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados (CAC/GL 59-2006). [consulta: 5 de septiembre de 2017]. Disponible en: [www.fao.org/input/download/standards/10692/cxg\\_059s.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/10692/cxg_059s.pdf).

Ravelo-Pérez L.M., Hernández-Borges J., Asensio-Ramos M., Rodríguez-Delgado M.Á. Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(43):7336-7345.

Roca M., Leon N., Pastor A., Yusà V. Comprehensive analytical strategy for biomonitoring of pesticides in urine by liquid chromatography–orbitrap high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2014;1374:66–76.

Saillenfait A.M., Ndiaye D., Sabaté J.P. Pyrethroids: Exposure and health effects - An update. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(3):281–292.

Saito S., Ueyama J., Kondo T., Saito I., Shibata E., Gotoh M., Nomura H., Wakusawa S., Nakai K., Kamijima M. A non-invasive biomonitoring method for assessing levels of urinary pyrethroid metabolites in diapered children by gas chromatography–mass spectrometry. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2014;24(2):200–207.

Schettgen T., Dewes P., Kraus T. A method for the simultaneous quantification of eight metabolites of synthetic pyrethroids in urine of the general population using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(20):5467–5478.

Smith P.A., Thompson M.J., Edwards J.W. Estimating occupational exposure to the pyrethroid termiticide bifenthrin by measuring metabolites in urine. *Journal of Chromatography B*. 2002;778(1-2):113-120.

Tao L., Chen M., Collins E., Chensheng L. Simultaneous quantitation of seven pyrethroid

metabolites in human urine by capillary gas chromatography– mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2013;36(4):773–80

Toshima H., Yoshinaga J., Shiraishi H., Ito Y., Kamijima M., Ueyama J. Comparison of different urine pretreatments for biological monitoring of pyrethroid insecticides. *Journal of analytical toxicology.* 2015;39(2):133-136.

Trunnelle K.J., Bennett D.H., Ahn K.C., Schenker M.B., Tancredi D.J., Gee S.J., Stoecklin-Marois M.T., Hammock B.D. Concentrations of the urinary pyrethroid metabolite 3-phenoxybenzoic acid in farm worker families in the MICASA study. *Environ Res.* 2014;131:153–159.

Tsuji R., Yamada T., Kawamura S. Mammal Toxicology of Synthetic Pyrethroides. *Top Curr Chem.* 2012;314: 83–112.

Ueyama J., Kimata A., Kamijima M., Hamajima N., Ito Y., Suzuki K., Inoue T., Yamamoto K., Takagi K., Saito I., Miyamoto K., Hasegawa T., Kondo T. Urinary excretion of 3-phenoxybenzoic acid in middle-aged and elderly general population of Japan. *Environmental research.* 2009;109(2):175-180.

Wang D., Kamijima M., Imai R., Suzuki T., Kamada Y., Asai K., Okamura A., Naito H., Ueyama Y., Saito I., Nakajima T., Goto M., Shibata E., Kondo T., Takagi K., Takagi K., Wakusawa

S.. Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *Journal of occupational health.* 2007;49(6):509-514.

Wei B., Mohan K.R., Weisel C.P. Exposure of flight attendants to pyrethroid insecticides on commercial flights: urinary metabolite levels and implications. *International journal of hygiene and environmental health.* 2012;215(4):465-473.

Wielgomas B.W., Marcin W., Wojciech C. Development of hollow fiber-supported liquid phase microextraction and HPLC-DAD method for the determination of pyrethroid metabolites in human and rat urine. *Biomedical Chromatography.* 2014; 28(5):708-716.

Wielgomas B., Nahorski W., Czarnowski W. Urinary concentrations of pyrethroid metabolites in the convenience sample of an urban population of Northern Poland. *Int J Hyg Environ Health.* 2013;216(3):295–300.

Yoshida T. Analytical Method for Pyrethroid Metabolites in Urine of the Non-Occupationally Exposed Population by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of chromatographic science.* 2017;55(9): 873-881.

Ye X., Pan W., Zhao Y., Zhao S., Zhu Y., Liu W., Lui j. Association of pyrethroids exposure with onset of puberty in Chinese. *Environ Pollut.* 2017;227:606–612.

## REVISIÓN

---

### Hidroarsenicismo: mecanismos de acción asociados a la toxicidad del arsénico

#### Hydroarsenicism: Mechanisms of action related to arsenic toxicity

Olmos, Valentina\*; Ridolfi, Adriana S.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Catedra de Toxicología y Química Legal. Junín 956, 7º, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

\*volmos@ffyb.uba.ar

Recibido: 15 de mayo de 2018

Aceptado: 30 de mayo de 2018

**Resumen.** La exposición crónica al arsénico (As) inorgánico a través del agua de bebida da lugar al desarrollo de la enfermedad conocida como hidroarsenicismo. Esta enfermedad presenta sintomatología característica, sin embargo, para la mayoría de los efectos tóxicos que produce del As aún no se conoce en detalle el mecanismo de acción tóxica. Los mecanismos moleculares de acción del arsenito (unión a grupos sulfhidrilos) y del arseniato (sustitución del fosfato) están bien identificados, sin embargo, las consecuencias a nivel subcelular, celular, tisular y orgánico de esos mecanismos todavía presentan muchos huecos por llenar. A nivel subcelular y celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) son los mecanismos de acción tóxica del As más estudiados últimamente. Se los ha vinculado con la diferenciación y proliferación de queratinocitos, con la disfunción endotelial, con la resistencia a la insulina, con la inducción de peroxidación lipídica en hígado, de necrosis tubular renal y con cambios en la expresión del receptor estrogénico. Por último, la respuesta celular a proteínas no plegadas (como consecuencia del estrés del retículo endoplásmico) podría ser un mecanismo para explicar la afectación de la inmunidad humoral y la celular.

**Palabras clave:** Arsénico; Mecanismos de acción, Hidroarsenicismo; Estrés oxidativo

**Abstract.** Chronic exposure to inorganic arsenic (As) through drinking water leads to the development of the disease known as hydroarsenicism. This disease presents characteristic symptomatology but the mechanisms underlying most of the toxic effects produced by As are not fully understand. The molecular mechanisms of action of arsenite (binding to sulfhydryl groups) and arsenate (phosphate substitution) are well identified, however, the consequences at the subcellular, cellular, tissue and organic levels of these mechanisms still have many gaps to fill. At the subcellular and cellular level, the generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are the most studied mechanisms of toxic action. They have been linked to the differentiation and proliferation of keratinocytes, endothelial dysfunction, insulin resistance, induction of lipid peroxidation in the liver, renal tubular necrosis and changes in the expression of estrogen receptor. Finally, the cellular response to unfolded proteins (as a consequence of the stress of the endoplasmic reticulum) could be a mechanism to explain the affectation of humoral and cellular immunity.

**Keywords:** Arsenic; Mechanisms of action, Hydroarsenicism; Oxidative stress

### Introducción

La exposición crónica durante años al As a través del agua de bebida da lugar al desarrollo de la enfermedad conocida como hidroarsenicismo. Esta enfermedad presenta sintomatología característica, sin embargo, para la mayoría de los efectos tóxicos que produce del As aún no se conoce en detalle el mecanismo de acción tóxica.

Las propiedades químicas del As fueron las que abrieron el camino hacia los potenciales mecanismos moleculares de acción tóxica.

Las primeras propuestas de mecanismos de acción aparecieron a principios del siglo XX y estuvieron relacionadas a las propiedades químicas conocidas, hasta ese momento, de los compuestos de As. Por ejemplo: la afinidad por los grupos sulfhidrilos del arsenito (As<sup>III</sup>) y la similitud estructural del arseniato (As<sup>V</sup>) con el fosfato. Un factor importante a la hora de analizar los mecanismos de acción y la toxicidad de los compuestos del As además de su valencia (trivalente o pentavalente), se relaciona con el tipo de compuesto

(por ejemplo: metilado o no metilado).

Actualmente se investigan varios mecanismos de acción como responsables de los efectos adversos y tóxicos del As y, además, se cree que estos mecanismos podrían ser interdependientes. Las líneas de investigación van desde las acciones a nivel molecular de los compuestos de As, siguiendo con sus efectos a nivel subcelular, celular, tisular, orgánico y sistémico.

Para una mejor comprensión de la toxicodinamia del As, esta revisión se organizó en tres niveles:

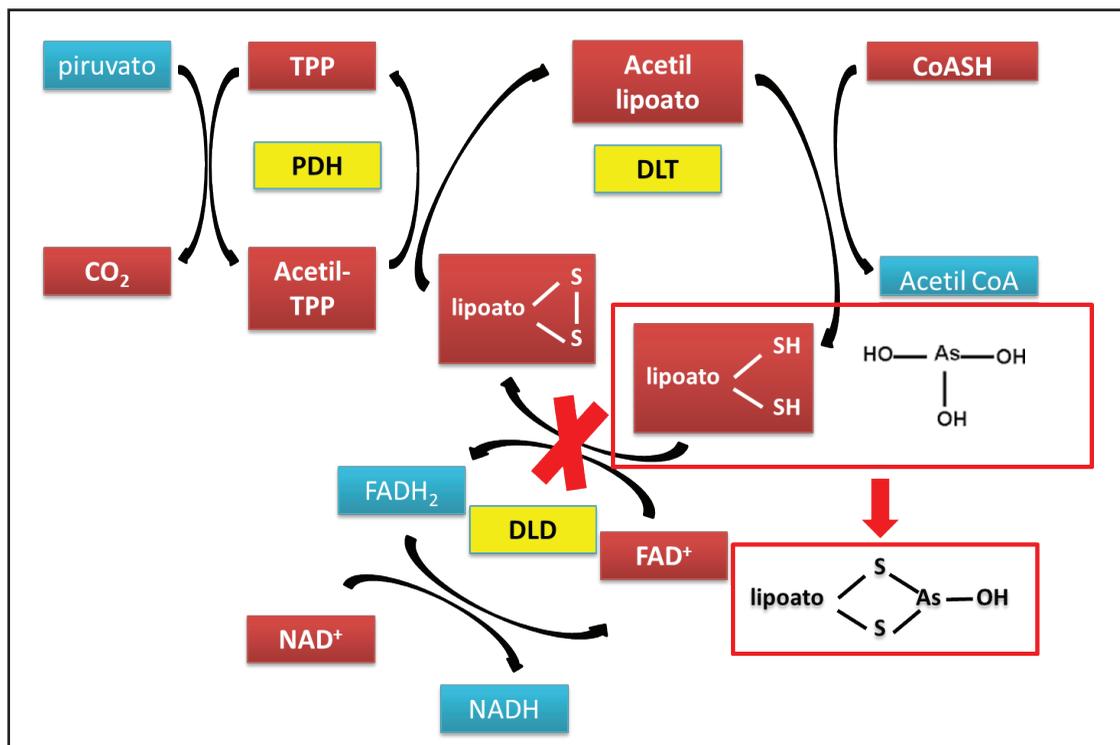
1. Mecanismos de acción moleculares y efectos subcelulares y celulares
2. Efectos en tejidos, órganos y sistemas y los mecanismos de acción involucrados
3. Mecanismos de acción asociados a carcinogénesis

## 1. Mecanismos de acción moleculares y efectos subcelulares y celulares

### 1.1. Unión a grupos sulfhidrilos

La primera evidencia de acción tóxica a tra-

vés de este mecanismo se demostró sobre el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc). El PDHc está compuesto por tres enzimas: piruvato deshidrogenasa (PDH), dihidrolipoil transacetilasa (DLT) y dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD), y por varios cofactores enzimáticos (Figura 1). Este complejo cataliza la producción de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), acetil coenzima A (ACoA) y flavina adenina dinucleótido reducido (FADH<sub>2</sub>). Se comprobó que el arsenito y los arsenicales metilados trivalentes se unen al ácido lipoico, una molécula con grupos sulfhidrilos vecinales, que participa del PDHc como cofactor enzimático (Figura 1). De esta manera se interrumpe la producción de NADH, ACoA y FADH<sub>2</sub>. La ACoA es un precursor de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y el NADH y el FADH<sub>2</sub> se utilizan en la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) por la vía de la fosforilación oxidativa. La inhibición del PDHc interrumpe el ciclo del ácido cítrico y la producción de ATP llevando al daño y a la muerte celular.



**Figura 1.** Reacciones catalizadas por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHc) e inhibición provocada por el arsenito.

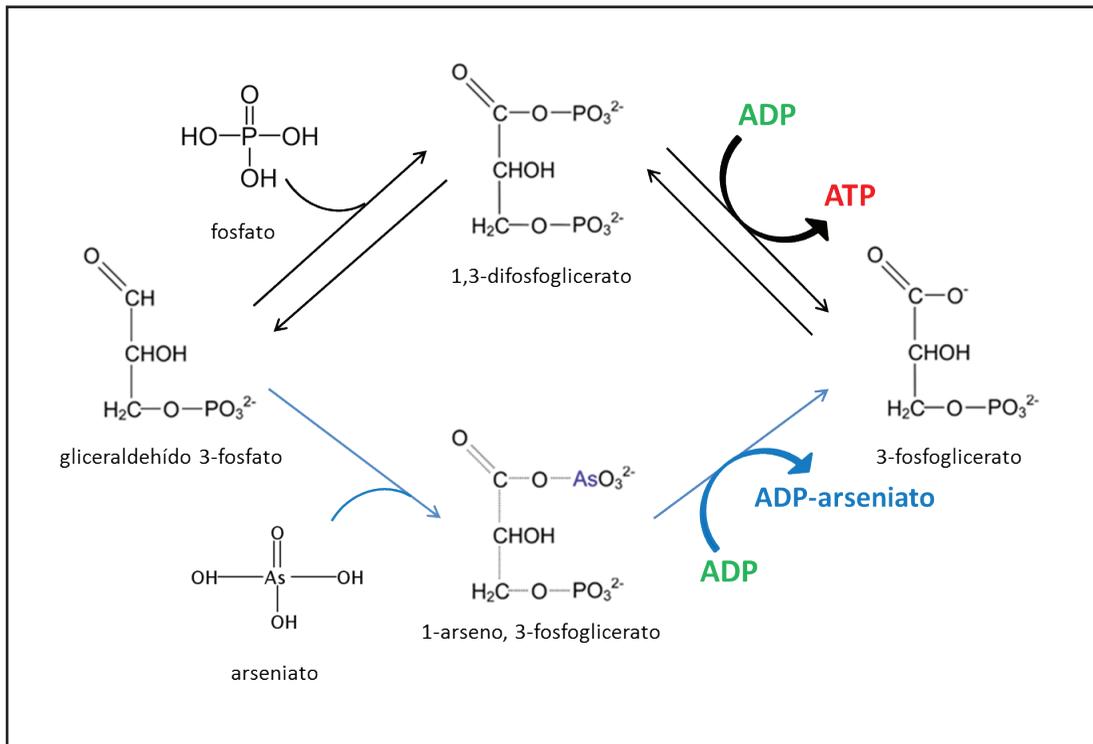
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono, Acetil-TPP: acetil tiamina pirofosfato, TPP: tiamina pirofosfato, PDH: piruvato deshidrogenasa, DLT: dihidrolipoil transacetilasa, CoASH: coenzima A, Acetil CoA: acetil coenzima A, DLD: dihidrolipoil deshidrogenasa, FAD<sup>+</sup>: flavina adenina dinucleótido oxidado, FADH<sub>2</sub>: flavina adenina dinucleótido reducido, NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado, NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

Además, a través del mismo mecanismo de unión a grupos sulfhidrilos, el arsenito y los intermediarios metabólicos trivalentes del As inhiben casi 200 proteínas y enzimas. Entre ellas, se pueden mencionar, la glutatión reductasa, la tioredoxina, la tioredoxina reductasa, las ADN ligasas, las enzimas reparadoras de ADN y la piruvato kinasa (Hughes 2002, Shen y col. 2013). La inhibición se produce por unión del As a grupos sulfhidrilos de cisteínas localizadas en posiciones clave de la estructura proteica, de los sitios activos enzimáticos o por unión a cofactores enzimáticos ditiólicos. En muchos de los casos, los intermediarios metabólicos metilados trivalentes del As, como el ácido monometilarsenioso (MMAIII) y el ácido dimetil arsenioso (DMAIII), son inhibidores más potentes que el arsenito, y todos ellos, a su vez, son inhibidores mucho más potentes que los intermediarios metabólicos pentavalentes ácido monometilarsónico (MMAV) y el ácido dimetil arsínico (DMAV).

### 1.2. Sustitución del grupo fosfato

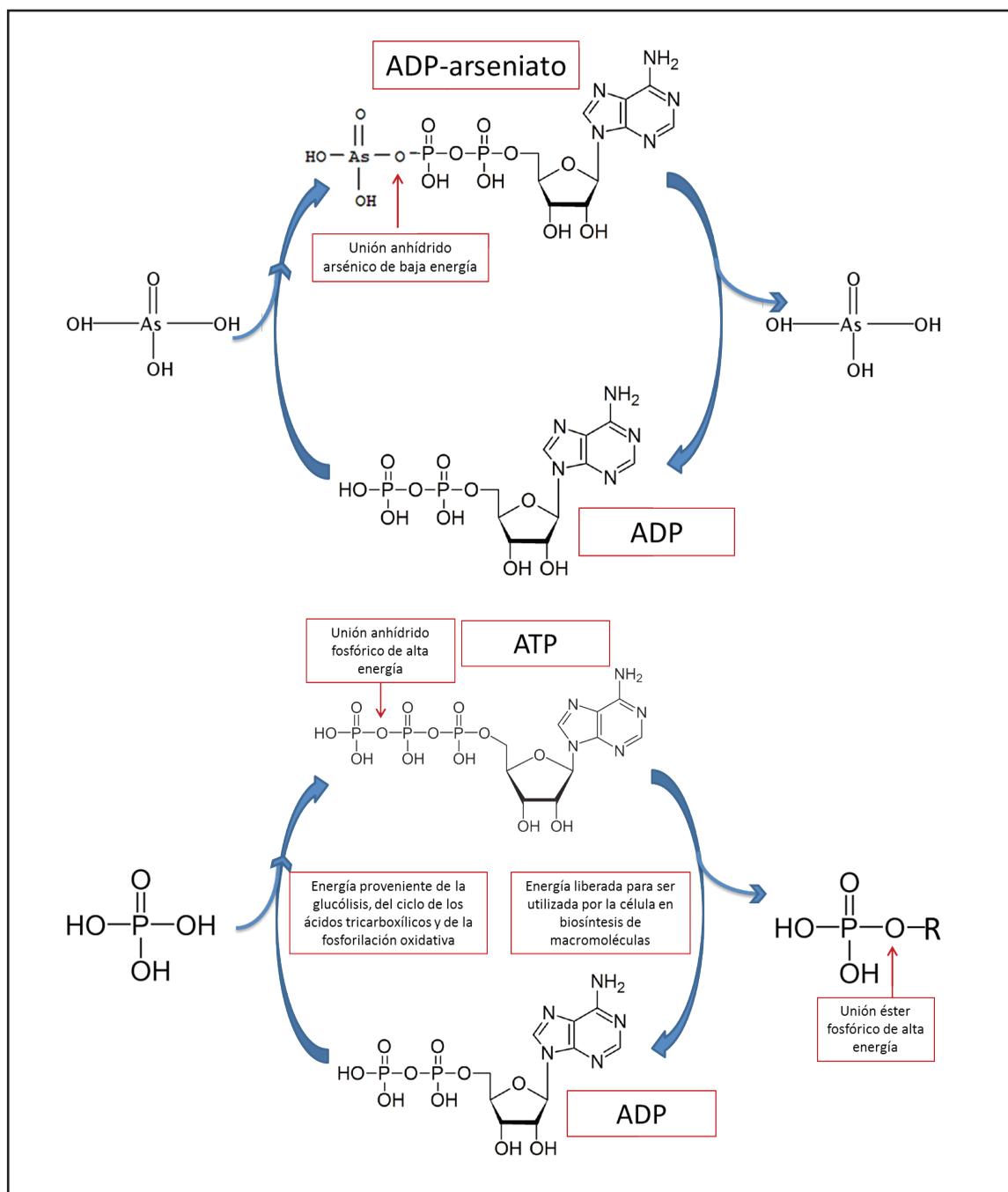
El ácido arsénico ( $\text{AsO}_4\text{H}_3$ ) y el ácido fosfórico ( $\text{PO}_4\text{H}_3$ ) tienen una estructura química similar y sus constantes de disociación también son similares, razón por la cual el arseniato puede sustituir al fosfato en muchas reacciones bioquímicas. En estas reacciones, el arseniato se une a grupos hidroxilos dando como resultado ésteres de arseniato. Sin embargo, la unión éster formada por el arseniato tiene mayor longitud que la formada por el fosfato, lo cual lleva a que los ésteres de arseniato sean más lábiles (menos estables) y se hidrolicen más fácilmente (Hughes y col. 2011).

El arseniato desacopla la formación de ATP in vitro por un mecanismo que se conoce como arsenolisis. La arsenolisis puede ocurrir en el proceso de la glucólisis y en la fosforilación oxidativa. En la glucólisis, el arseniato forma el 1-arseno, 3-fosfoglicerato (Figura 2) y en la fosforilación oxidativa el arseniato puede acoplarse a la adenosina difosfato (ADP) para formar el ADP-arsenato (Figura 3).



**Figura 2.** Esquema de la incorporación de fosfato (arriba) o arseniato (abajo) en el pasaje de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato de la glucólisis.

ADP: adenosina difosfato, ATP: adenosina trifosfato



**Figura 3.** Formación de adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) (arriba) y formación de ADP-arseniato a partir de ADP (abajo).

ADP: adenosina difosfato, ATP: adenosina trifosfato

### 1.3. Generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) son los mecanismos de acción tóxica del As más estudiados últimamente (Flora 2011, Hughes y col. 2011). En estudios *in vitro* e *in vivo* se

identificaron varias ERO: anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, entre otras, como resultantes de la acción del As. El mecanismo de producción de ERO por parte del As no está totalmente establecido, podría tratarse de un mecanismo directo de inducción de peroxidación lipídica por parte

del arsenito o sus intermediarios metabólicos, podrían generarse como consecuencia de la inhibición de la actividad de enzimas como la glutatión reductasa y la tioredoxina reductasa, las cuales son parte de la defensa que tiene la célula contra el daño oxidativo o podrían generarse debido a la estimulación de las enzimas NADH o NADPH oxidasas (Hughes 2002, Samikkanu y col. 2003, Hei y Filipic 2004, Flora 2011, Hughes y col. 2011, Jomova y col. 2011, Dodmane y col. 2013).

Otro mecanismo que se postula para la formación de ERO es a través de la liberación del hierro (Fe) de la ferritina. El ácido dimetil arsenioso (DMAIII) aumenta significativamente la liberación de Fe de la ferritina. El ácido dimetil arsínico (DMAV) produce el mismo efecto solo en presencia de un reductor como el ácido ascórbico. El arseniato, el arsenito, el monometil arsenioso (MMAIII) y el monometil arsínico (MMAV) no parecen actuar por este mecanismo (Hughes 2002).

## 2. Efectos en tejidos, órganos y sistemas. Mecanismos de acción involucrados

### 2.1 Efectos sobre la piel

Las lesiones cutáneas son las manifestaciones más conocidas de la exposición crónica al As. El tipo de lesiones que predominan son queratosis, hiperpigmentación y neoplasias. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas lesiones se originan, continúan siendo investigados. Desde hace más de 30 años se vienen proponiendo varios mecanismos celulares, subcelulares y moleculares que podrían estar vinculados al desarrollo de las alteraciones dérmicas que provoca la exposición crónica al As. Entre ellos se pueden mencionar:

- La supresión de la expresión de proteínas clave en el proceso de diferenciación de los queratinocitos epidérmicos (involucrina, transglutaminasas, proteína rica en prolina 1 y filagrina, entre otras) (Kachinskas y col. 1994, Jessen y col. 2001). Todas estas proteínas y enzimas participan en la formación de la epidermis, particularmente en la diferenciación del queratinocito para formar el estrato córneo de la piel.
- La inducción de la sobreexpresión de factores de crecimiento (factor transformante de crecimiento alfa, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y receptor del factor de crecimiento epidérmico, entre otros) puede ocurrir en queratinocitos, como respuesta a estímulos am-

bientales (Germolec y col. 1996).

- Inducción de la proliferación de queratinocitos mediada por la regulación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) y el factor activador de proteínas-1 (AP-1) (Liao y col. 2004). Pi y col. (2008) mostraron que la activación del factor de transcripción nuclear Nrf2 en queratinocitos humanos, en respuesta a estresores oxidativos, incrementa la secreción de múltiples biomarcadores de transformación maligna, entre ellos la metaloproteinas-9 (MMP-9) y citoqueratinas, que contribuyen a la carcinogénesis de piel por exposición a arsénico. La citotoxicidad del As inorgánico y sus metabolitos metilados trivalentes en queratinocitos se relaciona con respuestas al estrés mediadas por la activación de Nrf2, interferón y p53 (Dodmane y col. 2013).

- Inducción de apoptosis (mediada por receptor) en queratinocitos: con aumento en la expresión del receptor Fas/FasL y con la subsecuente activación de las caspasas 8 (iniciadora) y 3 (ejecutora) (Liao y col. 2004).

- La activación de la respuesta mediada por proteínas no plegadas (UPR, por sus siglas en inglés, unfolded protein response). Esta activación se produciría como consecuencia de la generación de estrés oxidativo afectando particularmente al retículo endoplásmico, y daría como resultado una respuesta inflamatoria por parte de la piel (Li y col. 2011). La respuesta a proteínas no plegadas (UPR) es la respuesta del retículo endoplasmático al estrés oxidativo. Se desencadenan una serie de eventos que comienzan con la acumulación de proteínas no plegadas dentro del RE, su liberación al citoplasma celular y la activación de vías proteolíticas que intentan recuperar la homeostasis celular. Si ésta no se recupera, la UPR lleva a la apoptosis.

Estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente aunque se ha descrito que algunos podrían desencadenarse a concentraciones biológicas de As mayores que otros.

### 2.2. Efectos sobre el sistema cardiovascular

El aumento en la generación de ERO y de ERN, debidos a la exposición crónica al As, está propuesto como uno de los mecanismos relacionados con la aparición de efectos cardiovasculares (Singh y col. 2011). Las células del endotelio vascular y las adyacentes del

músculo liso vascular son blanco del arsenito y sus intermediarios metabólicos. Algunos autores atribuyen el aumento en la generación de ERO y de ERN, a la estimulación de la NADPH oxidasa, presente en la membrana plasmática de estas células (Edwards y col. 2013, Ellinsworth 2015). Este desbalance redox provoca lo que se conoce como disfunción endotelial (desbalance de los factores de contracción y relajación del endotelio), la cual es el marcador de efecto temprano de patologías como la aterosclerosis, la hipertensión o la enfermedad vascular periférica.

### 2.3. Efectos sobre el metabolismo de la glucosa

La arsenolisis y la formación del ADP-arseniato enlentecen el metabolismo de la glucosa, bloquean la obtención de energía e interfieren con la secreción (ATP-dependiente) de insulina (Singh y col. 2011). También, mediante la unión a grupos sulfhidrilos, el As puede bloquear la acción de la insulina, del receptor de insulina, del transportador de glucosa y de las enzimas del metabolismo de la glucosa (Singh y col. 2011). A su vez, la formación de ERO puede llevar a la sobreexpresión de estresores involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina (Singh y col. 2011). En conjunto, estas acciones pueden favorecer el desarrollo de diabetes mellitus en personas expuestas en forma crónica al As.

### 2.4. Neurotoxicidad

Se ha descrito que la exposición crónica al As a través del agua de bebida produce alteraciones en el desarrollo neurológico y cognitivo de los niños (Rodríguez Barranco y col. 2013), las cuales incluyen la afectación del coeficiente intelectual a escala completa, alteraciones en la memoria y la atención. También se ha asociado la exposición crónica al As con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y de polineuropatías símil síndrome de Guillain-Barré (Vahidnia y col. 2007, Singh y col. 2011). Los mecanismos de acción asociados a estos efectos no están dilucidados. Sin embargo, varios trabajos proponen hipótesis sobre mecanismos de acción. El mecanismo más mencionado es a través de la generación de estrés oxidativo por aumento en la producción de ERO y disminución en la capacidad antioxidante de la célula neuronal (Singh y col. 2011, Prakash y col. 2015). Lu y colaboradores (2014) describieron algunos mecanismos de inducción de apoptosis neuronal como el

mediado por la kinasa c-Jun N-terminal y la kinasa relacionada a la señalización extracelular (*c-Jun N-terminal* y *extracellular signal-related kinases*, JNK y ERK por sus siglas en inglés) o el mediado por las proteínas vinculadas al estrés del retículo endoplásmico como la proteína reguladora de glucosa 78 y la proteína homóloga a C/ERP (*glucose-regulated protein*, *C/EBP homologue protein*, GRP 78 y CHOP, por sus siglas en inglés).

Otros mecanismos incluyen la alteración del metabolismo de neurotransmisores (dopamina, noradrenalina y 5-hidroxitriptamina), la modulación del calcio intracelular y la sobreexpresión y la activación de calpaínas (proteasas tiólicas citosólicas dependientes de calcio) que pueden actuar sobre las proteínas del citoesqueleto axonal, alterándolo (Florea y col. 2005, Vahidnia y col. 2007, 2008, Rocha y col. 2011, Prakash y col. 2016). La elevada acumulación de especies de arsénico en la pituitaria, respecto a otras áreas cerebrales podría explicar los efectos neuroendocrinos asociados con la exposición a As (Sánchez-Peña y col. 2010). Es probable que estos potenciales mecanismos de acción del As sean interdependientes y que, además, se vinculen con los mecanismos por los cuales el As altera el metabolismo basal de todas las células (glucólisis y fosforilación oxidativa).

### 2.5. Hepatotoxicidad

El As induce daño hepático caracterizado por hepatomegalia, fibrosis portal (no-cirrótica) y, en algunos casos, alteración de las enzimas aspartato aminotransferasa y alanino aminotransferasa (Guha Mazumder 2005, Singh y col. 2011). Otras alteraciones hepáticas, como la hipertensión portal (no cirrótica), se describieron en casos de pacientes que recibieron tratamiento crónico con trióxido de arsénico. Los mecanismos vinculados a este tipo de daño se relacionan con un aumento en la generación de ERO, ya sea por aumento de la peroxidación lipídica, por disminución de los niveles de glutatión y tiorredoxina o a través de la inhibición de enzimas involucradas en la defensa antioxidante de la célula (catalasa, glutatión peroxidasa, tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa, entre otras) (Santra y col. 2000, Singh y col. 2011, Li y col. 2018). Está descrito que el estrés oxidativo puede llevar a la apoptosis de células hepáticas (posiblemente a través de la regulación por incremento de proteínas pro-apoptóticas) (Singh y col.

2011, Li y col. 2018). La apoptosis podría verse favorecida en los casos de deficiencia de folato o de hiperhomocisteinemia.

### 2.6. Nefrotoxicidad

El As se acumula en el riñón, y así ejerce su efecto tóxico, especialmente en el tubo conorneado proximal. El daño renal se caracteriza por necrosis tubular con aumento de la urea y la creatinina en sangre. El mecanismo propuesto es a través de la generación de estrés oxidativo (Singh y col. 2011), debido a la inhibición de la actividad de la glutatión peroxidasa y la glutatión S-transferasa (Matos y col. 2013), e induciendo la sobreexpresión del gen codificante de la hemooxigenasa 1 (Sasaki y col. 2007).

### 2.7. Toxicidad sobre el tracto gastrointestinal

Los efectos tóxicos y los mecanismos de acción del arsénico inorgánico y de sus metabolitos metilados sobre la mucosa gastrointestinal no son bien conocidos. Estudios recientes *in vitro* utilizando líneas celulares humanas de epitelio intestinal, han mostrado que las especies trivalentes de As producen diferentes grados de toxicidad, induciendo apoptosis y necrosis celular. Los mecanismos que afectan la viabilidad celular están asociados a la formación de especies reactivas de oxígeno, reducción de glutatión y peroxidación lipídica. Las especies pentavalentes de As no mostraron toxicidad (Calatayud y col. 2013).

### 2.8. Efectos sobre el sistema inmune

El As juega un rol importante en la disrupción de la inmunidad innata y la inmunidad mediada por células (Selgrade 2007, Dangleben y col. 2013). Trabajos recientes que intentaron dilucidar los mecanismos por los que estos efectos se producen, sugieren que la respuesta a proteínas no plegadas (UPR) podría ser un mecanismo para explicar la afectación de la inmunidad humoral y la celular tanto en función como en número (Banerjee y col. 2009, Srivastava y col. 2013, Hunt y col. 2014).

Se demostró que el As también interfiere con la vía de transducción de señalización de la activación del complejo receptor de células T (TCR) al aumentar los niveles de fosforilación de las quinasas Lck y Fyn (primeras quinasas asociadas al TCR). El incremento en la secreción del factor de estimulación de granulocitos y monocitos (GM-CSF) produciría un estado de inflamación crónica que se asocia con el desarrollo de cáncer. El As re-

duce la proporción de células T ayudadoras (CD4) en relación con la cantidad de células T citotóxicas (CD8) [CD4/CD8], este parámetro de inmunosupresión también contribuye a la carcinogénesis. Por lo tanto, repetidas y prolongadas exposiciones a As alteran la activación de linfocitos T y producen cambios funcionales del sistema inmune dependientes de la dosis y de los mecanismos de inmunotoxicidad (Soto-Peña y col. 2006, Soto-Peña y Vega 2008, Vega Loyo 2009).

### 2.9. Efectos sobre la reproducción y el eje adenohipofisario

Si bien se han reportado efectos adversos del As inorgánico sobre la función reproductiva, poco se conoce de sus acciones sobre la liberación hormonal y los mecanismos de acción sobre la fisiología adenohipofisaria. Estudios en animales han mostrado que el As afecta la salud reproductiva en hembras actuando como citotóxico y como disruptor endócrino, restringiendo la función y estructura del útero, alterando los niveles de gonadotropinas y esteroides (estradiol), produciendo aumento del peso corporal e intolerancia a la glucosa a bajas dosis (Akram y col. 2009, Chattopadhyay y Ghosh 2010, Rodriguez y col. 2016). En un trabajo reciente se demostró por primera vez que la administración de As inorgánico es capaz de inducir cambios en la expresión del receptor estrogénico (Re $\alpha$ ) en células epiteliales y el estroma del útero (Ronchetti 2014). Este estudio también evidenció que el As afecta de manera directa la adenohipofisis tanto *in vivo* como *in vitro*. Es capaz de generar estrés oxidativo en la glándula alterando la expresión de genes como *HO-1*, *MT-1* y *TRX-1* (codificantes de la hemooxigenasa 1, metalotioneína 1 y tioredoxina, respectivamente) (Ronchetti 2014). Además, el As disminuye la viabilidad de las células adenohipofisarias como consecuencia de la inducción de apoptosis y disminuye la liberación de prolactina (PRL). Considerando que la PRL cumple un rol fundamental en la fisiología reproductiva, es probable que el efecto sobre la secreción de esta hormona contribuya a las alteraciones reproductivas que se observan por exposición al As (Ronchetti 2014).

## 3. Mecanismos de acción asociados a carcinogénesis

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) inclu-

yó al As inorgánico en el Grupo 1, agentes o grupos de agentes carcinógenos para los seres humanos, debido a su capacidad para causar cáncer de piel, vejiga, hígado y/o pulmón (Jackson y Grainge 1975, Cantor y Lubin 2007, Liu y Waalkes 2008, IARC 2012). Sin embargo, así como ocurre para la mayoría de los efectos tóxicos del As, los mecanismos por los cuales se desarrollan los cánceres aún permanecen sin esclarecerse. La exposición crónica al As se ha vinculado con una variedad de procesos como proliferación celular, recombinación genética, inducción de genes e inducción de proteínas de choque térmico. En seres humanos, se identificaron algunos factores adicionales de riesgo de desarrollar los efectos deletéreos del As. Estos son: metilación aberrante del DNA, estrés oxidativo, hiperhomocisteinemia y deficiente capacidad para metabolizar (metilar) al As (Niedzwiecki y col. 2013, Howe y col. 2014, Niedzwiecki y col. 2014). A continuación se describen algunos de los mecanismos de acción propuestos para carcinogénesis.

### 3.1. Genotoxicidad

Aunque parece no ser un mutágeno directo, el As es responsable de causar daño al ADN en células de todos los mamíferos (Faita y col. 2013). El daño puede ser a nivel cromosómico y a nivel del ADN. Numerosos trabajos reportan que la exposición crónica al As produce un incremento de aberraciones cromosómicas, entre las que se mencionan: intercambio de cromátides hermanas, deleciones, micronúcleos, aneuploidías, daño oxidativo y rotura de cadenas (Gradecka y col. 2001, Hughes y col. 2011, Faita y col. 2013). Los arsenicales trivalentes son genotóxicos más potentes que los pentavalentes. El mecanismo molecular más relacionado con este daño es la producción de estrés oxidativo (Liu y col. 2001, Faita y col. 2013).

### 3.2. Alteración de la reparación del ADN

El As interfiere en la reparación del ADN, afectando enzimas de los sistemas de escisión y reparación de nucleótidos (NER) y de bases (BER) (Hughes y col. 2011, Faita y col. 2013, Holcomb y col. 2017). El sistema NER interviene reparando grandes daños en la doble hélice del ADN y el sistema BER interviene reparando el daño provocado por pequeñas roturas de la cadena simple de ADN. Una revisión reciente destaca el rol de este mecanis-

mo en la carcinogénesis producida por el As (Gentry y col. 2010), principalmente a través de la inhibición de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1, que participa en la reparación del daño al ADN de la célula (Huestis y col. 2016, Zhoe y col. 2016).

### 3.3. Modificación de histonas

La alteración de la metilación, acetilación y ubiquitinación de histonas puede afectar los procesos de reparación del ADN (He y col. 2010). Las enzimas encargadas de la modificación de histonas son proteínas que se caracterizan por presentar una estructura conocida como dedos de zinc. El As se une a esta estructura dedos de zinc inhibiendo la actividad de las enzimas que actúan sobre las histonas (Tam y col. 2017). En otras palabras, la alteración del proceso de modificación de histonas sería otro mecanismo por el cual el As afecta la reparación del ADN (Society of Toxicology 2017).

### 3.4. Alteración de la metilación del ADN

La alteración de la metilación del ADN produce cambios en la expresión de los genes. Está descrito que el As induce tanto hipo como hipermetilación del ADN. Estos cambios epigenéticos pueden producir activación de oncogenes o silenciamiento de genes supresores de tumores. Uno de los ejemplos más descritos es la hipermetilación del gen p53, codificante de una proteína supresora de tumores, la cual tiene un rol en la regulación del ciclo celular (Mass y Wang 1997, Chanda y col. 2006, Intarasunanont y col. 2012). La hipermetilación, con el consecuente silenciamiento de genes supresores de tumores, es un evento temprano implicado en el desarrollo de tumores malignos.

Los mecanismos por los cuales el As produce los cambios en la metilación del ADN no están claros. La hipometilación podría deberse a la inhibición de las ADN metiltransferasas, a la competencia (entre metiltransferasas) por la S-adenosil metionina (SAM), involucrada también en el metabolismo del As, o a la depleción de SAM por deficiencias nutricionales (Reichard y Puga 2010, Hughes y col. 2011). La hipermetilación resulta más difícil de explicar.

### 3.5. Proliferación celular

Una manifestación característica de la exposición crónica al As es la queratosis. En respuesta a estímulos ambientales, los que-

ratinocitos producen y secretan una serie de citocinas proinflamatorias y quimioquinas, como la interleuquina-1 $\alpha$ , el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , la interleuquina-8, así como factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Germolec y col. 1996, Dodmane y col. 2013). La sobreproducción de estos compuestos se ha vinculado con varios procesos patológicos, incluidas las neoplasias.

### 3.6. Transducción de señales

La transducción de señales es el mecanismo por el cual una señal del exterior de una célula se transmite al interior y provoca una alteración en la expresión de algunos genes de esa célula. El As puede afectar este mecanismo llevando a la activación o inhibición de factores de transcripción (proteínas que se unen al ADN y regulan la transcripción génica) (Hughes y col. 2011). Entre los factores de transcripción más estudiados se encuentran el AP-1, el NF- $\kappa$ B y p53 (Flora 2011).

### 3.7. Co-carcinogénesis

El As puede desempeñar el rol de co-carcinógeno promoviendo el desarrollo de cánceres iniciados por otros agentes físicos o químicos. Muchos trabajos dan cuenta de la capacidad del As de promover el daño cromosómico inducido (iniciado) por la radiación ultravioleta (UV) en células de mamíferos (Hughes 2002, Rossman y col. 2004, Hughes y col. 2011), a través de la inhibición, por parte del As, de los procesos de reparación del daño al ADN (Qin y col. 2008, Hughes y col. 2011, Hunt y col. 2014). El As entonces podría actuar como co-carcinógeno promoviendo el desarrollo de cáncer de piel debido a exposición a radiación UV. El As demostró también actuar incrementando la captación, por parte de la célula, de benzopireno diolepóxido (metabolito del benzo[a]pireno) y, de esta forma, favorecer la formación de aductos de ADN (Shen y col 2006). Este mecanismo explicaría el rol del As como co-carcinógeno, promotor del cáncer de pulmón debido a la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (presentes, por ejemplo, en el humo del tabaco).

### Conclusiones

El As interfiere en una gran cantidad de procesos biológicos fundamentales para la célula como el almacenamiento y la obtención

de energía, la reparación del daño al ADN o la inducción de apoptosis, entre muchos otros. Sin embargo, y a pesar de la cantidad de información disponible acerca de los potenciales mecanismos de acción tóxica, todavía quedan muchos huecos por llenar. Por ejemplo, es posible que los mecanismos involucrados requieran distintas concentraciones de As o distintos tiempos de exposición para manifestarse. También es posible que, aunque se presumen interrelacionados e interdependientes, no todos los mecanismos tengan lugar en todas las células, tejidos y órganos. Por último, muchos de los mecanismos de acción propuestos se estudiaron en modelos experimentales *in vitro* o en modelos animales lo cual implica realizar extrapolaciones entre dosis, vías de administración, tiempos de exposición y especies animales. En definitiva, la investigación sobre la toxicodinamia del As, si bien deja aún incertezas, ha permitido esclarecer los mecanismos moleculares implicados en algunos de los efectos tóxicos que produce este compuesto en el humano.

### Bibliografía citada

- Akram Z., Jalali S., Shami S.A., Ahmad L., Batool S., Kalsoom O. Adverse effects of arsenic exposure on uterine function and structure in female rat. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62(4):451-9.
- Banerjee N., Banerjee S., Sen R., Bandyopadhyay A., Sarma N., Majumder P., Das J.K., Chatterjee M., Kabir S.N., Giri A.K. Chronic arsenic exposure impairs macrophage functions in the exposed individuals. *J Clin Immunol.* 2009; 29 (5): 582-94.
- Calatayud M., Devesa V., Vélez D. Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicology Letters.* 2013; 218(1): 70-80.
- Cantor K.P., Lubin J.H. Arsenic, internal cancers, and issues in inference from studies of low-level exposures in human populations. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 222 (3): 252-7.
- Chanda S., Dasgupta U.B., Guha Mazumder D., Gupta M., Chaudhuri U., Lahiri S., Das S., Ghosh N., Chatterjee D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci.* 2006; 89 (2): 431-7.

Chattopadhyay S., Ghosh D. The involvement of hypophyseal-gonadal and hypophyseal-adrenal axes in arsenic-mediated ovarian and uterine toxicity: modulation by hCG. *J Biochem Mol Toxicol.* 2010; 24(1):29-41.

Dangleben N.L., Skibola C.F., Smith M.T. Arsenic immunotoxicity: a review. *Environ Health.* 2013;12(1):73.

Dodmane P.R., Arnold L.L., Kakiuchi-Kiyota S., Qiu F., Liu X., Rennard S.I., Cohen S.M. Cytotoxicity and gene expression changes induced by inorganic and organic trivalent arsenicals in human cells. *Toxicology.* 2013; 312: 18-29.

Edwards D.H., Li Y., Ellinsworth D.C., Griffith T.M. The effect of inorganic arsenic on endothelium-dependent relaxation: Role of NADPH oxidase and hydrogen peroxide. *Toxicology.* 2013;306:50-58.

Ellinsworth D.C. Arsenic, reactive oxygen, and endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;353 (3): 458-64.

Faita F., Cori L., Bianchi F., Andreassi M.G. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10 (4):1527-46.

Flora S.J. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(2):257-81.

Florea A.M., Yamoah E.N., Dopp E. Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction. *Environ Health Perspect.* 2005;113(6):659-64.

Gentry P.R., McDonald T.B., Sullivan D.E., Shipp A.M., Yager J.W., Clewell H.J. 3rd. Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in a mode of action for carcinogenicity. *Environ Mol Mutagen.* 2010;51(1):1-14.

Germolec D.R., Yoshida T., Gaido K., Wilmer J.L., Simeonova P.P., Kayama F., Burleson F., Dong W., Lange R.W., Luster M.I. Arsenic induces overexpression of growth factors in human keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;141(1):308-18.

Gradecka D., Palus J., Wasowicz W. Selected mechanisms of genotoxic effects of inorganic arsenic compounds. *Int J Occup Med Environ Health.* 2001;14(4):317-28.

He F., Umehara T., Saito K., Harada T., Watanabe S., Yabuki T., Kigawa T., Takahashi M., Kuwasako K., Tsuda K., Matsuda T., Aoki M., Seki E., Kobayashi N., Güntert P., Yokoyama S., Muto Y. Structural insight into the zinc finger CW domain as a histone modification reader. *Structure.* 2010;18(9):1127-39.

Hei T.K., Filipic M. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(5):574-81.

Holcomb N., Goswami M., Han S.G., Scott T., D'Orazio J., Orren D.K., Gairola C.G., Mellon I. Inorganic arsenic inhibits the nucleotide excision repair pathway and reduces the expression of XPC. *DNA Repair (Amst).* 2017;52:70-80.

Howe C.G., Niedzwiecki M.M., Hall M.N., Liu X., Ilievski V., Slavkovich V., Alam S., Siddique A.B., Graziano J.H., Gamble M.V. Folate and cobalamin modify associations between S-adenosylmethionine and methylated arsenic metabolites in arsenic-exposed Bangladeshi adults. *J Nutr.* 2014;144(5):690-7.

Huestis J., Zhou X., Chen L., Feng C., Hudson L.G., Liu K.J. Kinetics and thermodynamics of zinc(II) and arsenic(III) binding to XPA and PARP-1 zinc finger peptides. *J Inorg Biochem.* 2016;163:45-52.

Hughes M.F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett.* 2002;133(1):1-16.

Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A.S., Thomas D.J. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci.* 2011;123(2):305-32.

Hunt K.M., Srivastava R.K., Elmets C.A., Athar M. The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer Lett.* 2014;354(2):211-9.

Intarasunanont P., Navasumrit P., Waraprasit S., Chaisatra K., Suk W.A., Mahidol C., Ruchirawat M. Effects of arsenic exposure on DNA

methylation in cord blood samples from newborn babies and in a human lymphoblast cell line. *Environ Health.* 2012;11:31.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs 100C. Arsenic and arsenic compounds. 2012. [en línea]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-6.pdf> (Consulta 24 de noviembre de 2017)

Jackson R., Grainge J.W. Arsenic and cancer. *Can Med Assoc J.* 1975;113(5):396-401.

Jomova K., Jenisova Z., Feszterova M., Baros S., Liska J., Hudecova D., Rhodes C.J., Valko M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol.* 2011;31:95-107.

Kachinskas D.J., Phillips M.A., Qin Q., Stokes J.D., Rice R.H. Arsenate perturbation of human keratinocyte differentiation. *Cell Growth Differ.* 1994;5(11):1235-41.

Li C., Xu J., Li F., Chaudhary S.C., Weng Z., Wen J., Elmets C.A., Ahsan H., Athar M. Unfolded protein response signaling and MAP kinase pathways underlie pathogenesis of arsenic-induced cutaneous inflammation. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(12):2101-9.

Li Y., Zhang Y., Gao Y., Zhang W., Cui X., Liu J., Wei Y. Arsenic Induces Thioredoxin 1 and Apoptosis in Human Liver HHL-5 Cells. *Biol Trace Elem Res.* 2018;181(2):234-241.

Liao W.T., Chang K.L., Yu C.L., Chen G.S., Chang L.W., Yu H.S. Arsenic induces human keratinocyte apoptosis by the FAS/FAS ligand pathway, which correlates with alterations in nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activity. *J Invest Dermatol.* 2004;122(1):125-9.

Liu J., Waalkes M.P. Liver is a target of arsenic carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2008;105(1):24-32.

Liu S.X., Athar M., Lippai I., Waldren C., Hei T.K. Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1643-8.

Lu T.H., Tseng T.J., Su C.C., Tang F.C., Yen C.C., Liu Y.Y., Yang C.Y., Wu C.C., Chen K.L., Hung D.Z., Chen Y.W. Arsenic induces reactive

oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways. *Toxicol Lett.* 2014;224(1):130-40.

Mass M.J., Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res.* 1997;386(3):263-77.

Matos R.C., Bessa M., Oliveira H., Gonçalves F., de Lourdes Pereira M., Nunes B. Mechanisms of kidney toxicity for chromium- and arsenic-based preservatives: potential involvement of a pro-oxidative pathway. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36(3):929-36.

Mazumder D.N. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;206 (2):169-75.

Niedzwiecki M.M., Hall M.N., Liu X., Oka J., Harper K.N., Slavkovich V., Ilievski V., Levy D., van Geen A., Mey J.L., Alam S., Siddique A.B., Parvez F., Graziano J.H., Gamble M.V. A dose-response study of arsenic exposure and global methylation of peripheral blood mononuclear cell DNA in Bangladeshi adults. *Environ Health Perspect.* 2013;121(11-12):1306-12.

Niedzwiecki M.M., Hall M.N., Liu X., Slavkovich V., Ilievski V., Levy D., Alam S., Siddique A.B., Parvez F., Graziano J.H., Gamble M.V. Interaction of plasma glutathione redox and folate deficiency on arsenic methylation capacity in Bangladeshi adults. *Free Radic Biol Med.* 2014;73:67-74.

Pi J., Diwan B.A., Suna Y., Liua J., Qua W., Hed Y., Stybloe M., Waalkesa M.P. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: Involvement of Nrf2. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(5):651-658.

Prakash C., Soni M., Kumar V. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. *J Appl Toxicol.* 2016;36(2):179-88.

Qin X.J., Hudson L.G., Liu W., Timmins G.S., Liu K.J. Low concentration of arsenite exacerbates UVR-induced DNA strand breaks by inhibiting PARP-1 activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232(1):41-50.

Reichard J.F., Puga A. Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics*. 2010;2(1):87-104.

Rocha R.A., Gimeno-Alcañiz J.V., Martín-Ibañez R., Canals J.M., Vélez D., Devesa V. Arsenic and fluoride induce neural progenitor cell apoptosis. *Toxicol Lett*. 2011;203(3):237-44.

Rodriguez K.F., Ungewitter E.K., Crespo-Mejias Y., Liu C., Nicol B., Kissling G.E., Yao H.H. Effects of in utero exposure to arsenic during the second half of gestation on reproductive end points and metabolic parameters in female CD-1 mice. *Environ Health Perspect*. 2016;124:336-343.

Rodríguez-Barranco M., Lacasaña M., Aguilar-Garduño C., Alguacil J., Gil F., González-Alzaga B., Rojas-García A. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ*. 2013;454-455:562-77.

Ronchetti S.A. Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis. Mecanismos de acción. Tesis doctoral. Biblioteca Digital FCEN-UBA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2014. pp 147. [www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Rossmann T.G., Uddin A.N., Burns F.J. Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;198(3):394-404.

Samikkannu T., Chen C.H., Yih L.H., Wang A.S., Lin S.Y., Chen T.C., Jan K.Y. Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(3):409-14.

Sánchez-Peña L.C., Petrosyan P., Morales M., González N.B., Gutiérrez-Ospina G., Del Razo L.M., Gonsebatt M.E. Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ Res*. 2010;110(5):428-34.

Santra A., Maiti A., Das S., Lahiri S., Charkaborty S.K., Mazumder D.N. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2000;38(4):395-405.

Sasaki A., Oshima Y., Fujimura A. An approach to elucidate potential mechanism of renal toxicity of arsenic trioxide. *Exp Hematol*. 2007;35(2):252-62.

Selgrade M.K. Immunotoxicity: the risk is real. *Toxicol Sci*. 2007;100(2):328-32.

Shen S., Lee J., Sun X., Wang H., Weinfeld M., Le X.C. Elevation of cellular BPDE uptake by human cells: a possible factor contributing to co-carcinogenicity by arsenite. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1832-7.

Shen S., Li X.F., Cullen W.R., Weinfeld M., Le X.C. Arsenic Binding to Proteins. *Chem Rev*. 2013;113:7769-7792.

Singh A.P., Goel R.K., Kaur T. Mechanisms Pertaining to Arsenic Toxicity. *Toxicol Int*. 2011;18(2):87-93.

Society of Toxicology (SOT). The Complexities in Assessing the Risk to Public Health of Low-Level Arsenic Exposure. SOT Issue Statement. [en línea] SOT Council, November 2017. Disponible en: <https://www.toxicology.org/pubs/statements/SOT-Low-Level-Arsenic-Exposure-Issue-Statement.pdf> [Consulta: 6 de diciembre de 2017]

Soto-Peña G.A., Luna A.L., Acosta-Saavedra L., Conde-Moo P., López-Carrillo L., Cebrián M. E., Bastida M., Calderón-Aranda E.S., Vega L. Assessment of lymphocyte subpopulations and cytokine secretion in children exposed to arsenic. *The FASEB Journal*. 2006;20(6):779-781.

Soto-Peña G.A., Vega L. Arsenic interferes with the signaling transduction pathway of T cell receptor activation by increasing basal and induced phosphorylation of Lck and Fyn in spleen cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008;230(2):216-226.

Srivastava R.K., Li C., Chaudhary S.C., Ballestas M.E., Elmets C.A., Robbins D.J., Matalon S., Deshane J.S., Afaq F., Bickers D.R., Athar M. Unfolded protein response (UPR) signaling regulates arsenic trioxide-mediated macrophage innate immune function disruption. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(3):879-87.

Tam L.M., Jiang J., Wang P., Li L., Miao W., Dong X., Wang Y. Arsenite Binds to the Zinc Finger

Motif of TIP60 Histone Acetyltransferase and Induces Its Degradation via the 26S Proteasome. *Chem Res Toxicol.* 2017;30 (9):1685-1693.

Vahidnia A., Romijn F., van der Voet G.B., de Wolff F.A. Arsenic-induced neurotoxicity in relation to toxicokinetics: effects on sciatic nerve proteins. *Chem Biol Interact.* 2008;176 (2-3):188-95.

Vahidnia A., van der Voet G.B., de Wolff F.A. Arsenic neurotoxicity--a review. *Hum Exp Toxicol.* 2007;26(10):823-32.

Vega Loyo L. Mecanismos moleculares de

los efectos biológicos del arsénico. En: Bustos Jaimes I., Castañeda Patlán C., Rendón Huerta E., Reyes Vivas H., Romero Álvarez I., (eds). *Mensaje Bioquímico*, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>.

Zhou X., Cooper K.L., Huestis J., Xu H., Burchiel S.W., Hudson L.G., Liu K.J. S-nitrosation on zinc finger motif of PARP-1 as a mechanism of DNA repair inhibition by arsenite. *Oncotarget.* 2016;7(49):80482-80492.

## 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 las 1000 palabras.

*Acta Toxicológica Argentina* (en adelante *Acta*), publicará contribuciones en español, portugués y/o inglés. Todas serán evaluadas por al menos dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo de los editores. Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. La identidad de autores y revisores se mantendrá en forma confidencial.

### Envío de manuscritos

El envío de manuscritos se realizará a través del Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) del Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT). En

la página web del PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> se encuentran las instrucciones para los autores.

### **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.htm>Article

B. Página en internet

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

c. Parte de una página de internet

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

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

## INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

---

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

The goal of *Acta Toxicológica Argentina* is to publish articles concerning all areas of Toxicology, including original articles, case reports, short communications, revisions, popularization of science articles, technical notes, images, thesis summaries, letters to the editor and relevant news.

**Original articles** must detail complete research and should be organized into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion (the last two can be combined into one section).

**Case reports** include description of clinical case studies which represent a contribution to the field of Toxicology.

**Short communications** are brief, concise articles that contribute to the respective area of Toxicology.

**Revisions or updates** comprise studies where an extensive revision of a topic of current importance and/or interest has been carried out.

**Articles concerned with popular science and special articles** can comment on a broad range of toxicological topics.

**Technical notes** should briefly describe new devices or analytical techniques validated by conclusive experimental studies.

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

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

Such images should be not necessarily 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 200 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 words.

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 Toxicological 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 submis-

sion 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., Tenover F.C. *Medical microbiology.* 4<sup>th</sup> 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 Online 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 Prac-

tice 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](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 aceite 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 e 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 tu-

mors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw- Hill; 2002. p. 93-113.

#### **4. Material eletrônico**

**a.** Artigo em publicação periódica em internet

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

**b.** Página de internet

Cancer-Pain.org [en línea]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [atualizado em 16 de Maio de 2002; consulta 9 de Julho de 2002]. Dispo-

nível em: [http:// www.cancer-pain.org/](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](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).