

# *Acta Toxicológica Argentina*

---

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 26  
N° 2  
Septiembre 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

## Asociación Toxicológica Argentina

### Comisión directiva

#### Presidente

Mirtha M. Nassetta

#### Vicepresidente

Ricardo A. Fernández

#### Tesorera

Mirta Ryczel

#### Secretaria

Julieta 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

Julieta 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 (SEDROAR), 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

Niveles urinarios de ácido trans, trans mucónico y orto cresol en una población infante-juvenil residente en Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense  
*Astolfo, María Agustina; Espíndola, Cristian Fabián; Sassone, Adriana Haydée* ..... 57

Toxic, cytotoxic and genotoxic potential of synthetics food flavorings  
*Barros Rocha, Romário; Peron, Ana Paula\*; Silva Santos, Fabelina Karollyne; Mendes Marques, Márcia Maria; Silva Sousa, Maria Eduarda; de Oliveira, Valtânia Ana; do Nascimento, Andressa Larissa* ..... 65

Avaliação da atividade da enzima glutationa-s-transferase da minhoca *Eisenia foetida* exposta à ivermectina  
*Moreira Tuerlinckx, Sandro; Hahn Delfim, Daniel; Kalil Huber, Ana Cláudia; Araújo Gamboa Morselli, Tânia Beatriz* ..... 71

### Reportes de casos

Acute carbon monoxide poisoning with coexisting cerebral and myocardial infarction: The brain-heart connection and challenges of management in resource-limited settings  
*Oghuvwu, Sunday Omokiniovo; Isah, Ohumagho Ambrose; Opadeyi Olowofela, Abimbola; Ayinbuomwan, Stephen* ..... 83

Instrucciones para los autores ..... 87

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

### Niveles urinarios de ácido *trans, trans* mucónico y *ortho* cresol en una población infanto-juvenil residente en Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense

#### Urinary levels of *trans, trans* muconic and *ortho* cresol in an infant-juvenile population resident in the Autonomous City of Buenos Aires and the Conurbano of Buenos Aires

Astolfo, María Agustina; Espindola, Cristian Fabián; Sassone, Adriana Haydée\*

Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Combate de los Pozos 1881 (C 1245 AAM). Buenos Aires. Argentina.  
\*asassone@garrahan.gov.ar

Recibido: 4 de marzo de 2018

Aceptado: 29 de agosto de 2018

**Resumen.** Introducción: la exposición crónica al benceno y tolueno produce alteraciones sobre la médula ósea y el sistema nervioso central, entre otros. En orina, el ácido *trans, trans* mucónico (*t, t*-MA) es uno de los biomarcadores de exposición al benceno y el *o*-cresol (*o*Cre) al tolueno. Objetivo: analizar los resultados de los niveles de *t, t*-MA y *o*Cre urinarios en una población infanto-juvenil residente en Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense potencialmente expuesta a benceno y tolueno ambiental. Materiales y métodos: se realizó un estudio retrospectivo de los resultados de *t, t*-MA y *o*Cre urinarios. Las muestras de orina ingresaron al laboratorio con solicitud de *t, t*-MA (n=1519) y *o*Cre (n=1447) durante el período 2011-2017 (rango etario entre 0 a 19 años). El *t, t*-MA se cuantificó por UFLC con detector de arreglo de diodos y el *o*Cre por CG con detector de ionización por llama. Resultados: la edad promedio de los pacientes fue de 4,8 años y la mediana 4,6 años. Las concentraciones de *t, t*-MA urinario fueron: menor de 50 µg/l (44,8%); entre 50-500 µg/l (52,1%) y mayores de 500 µg/l (3,1%). Expresadas por gramo de creatinina: entre 15-163 µg/g creatinina (60,4%) y mayores de 163 µg/g creatinina (39,6%). El límite de cuantificación de *t, t*-MA fue de 50 µg/l. Las concentraciones de *o*Cre urinario fueron: menor de 0,20 mg/l (97,7%) y entre 0,20-0,50 mg/l (2,3%) y mayor de 0,50 mg/l (0%). Expresadas por gramo de creatinina: menor de 0,30 mg/g creatinina en el 0,8% y mayores de 0,30 mg/g creatinina en el 1,5%. El límite de cuantificación de *o*Cre fue de 0,20 mg/l. Conclusiones: los resultados del trabajo podrían indicar una contaminación ambiental persistente, en especial en el Conurbano Bonaerense, donde debería continuarse el monitoreo de algunas zonas. Pero, por otro lado, es de vital importancia tener en cuenta los factores de confusión, tales como la dieta, la exposición al humo de tabaco ambiental (fumador pasivo) y la tasa de excreción renal que llevarían a una sobre-estimación de los resultados y a una incorrecta toma de decisiones.

**Palabras clave:** Ácido *trans, trans* mucónico; *Ortho* cresol; Población infanto-juvenil; Hidrocarburos aromáticos

**Abstract.** Introduction: Chronic exposure to benzene and toluene produces alterations in the bone marrow and the central nervous system, among other effects. In urine, *trans, trans* muconic acid (*t, t*-MA) is one of the biomarkers of exposure to benzene and *o*-cresol (*o*Cre), to toluene. Objective: To analyze the results of urinary *t, t*-MA and *o*Cre levels in an infant-juvenile population resident in the Autonomous City of Buenos Aires and the Conurbano Bonaerense, potentially exposed to environmental benzene and toluene. Materials and methods: A retrospective study of urinary *t, t*-MA and *o*Cre results was performed. The urine samples entered the laboratory with the request of *t, t*-MA (n = 1519) and *o*Cre (n = 1447) during the period 2011- 2017. The age range of the population was between 0 and 19 years. The *t, t*-MA was quantified by UFLC with diode array detector and the *o*Cre by GC with flame ionization detector. Results: The average age of the patients was 4.8 years and the median age was 4.6 years. The urinary concentrations of *t, t*-MA were: below 50 µg/l (44.8%); between 50-500 µg/l (52.1%) and above 500 µg/l (3.1%). Expressed per gram of creatinine: between 15-163 µg/g creatinine (60.4%) and greater 163 µg/g creatinine (39.6%). The limit of quantification of *t, t*-MA was 50 µg/l. The urinary *o*Cre concentrations were: less than 0.20 mg/l (97.7%) and between 0.20-0.50 mg/l (2.3%). Expressed per gram of creatinine: less than 0.30 mg/g creatinine in 0.8% and greater than 0.30 mg/g creatinine in 1.5%. The limit of quantification of *o*Cre was 0.20mg/l. Conclusions: The results of the study could indicate persistent environmental contamination, especially in the Conurbano Bonaerense, where monitoring of some areas should be continued. However, it is of vital importance to take into account the confounding factors, such as diet, exposure to environmental tobacco smoke (passive smoking) and the rate of renal excretion, which would lead to an over-estimation of the results and to incorrect decision-making.

**Keywords:** *Trans, trans* muconic acid; *Ortho* cresol; Infant-juvenile population; Aromatic hydrocarbons

## Introducción

El tolueno y el benceno son hidrocarburos aromáticos. El tolueno es utilizado principalmente como disolvente orgánico en muchos procesos industriales como la producción de plástico, la síntesis química y la fabricación de combustible (Cruz y col. 2014), esmaltes de uñas y otros cosméticos, pegamentos, pinturas, tintas y algunos productos de limpieza (Lovreglio y col. 2010).

El benceno se encuentra mayormente en el aire como producto de las emisiones de la quema de carbón y aceites, los vapores y combustión de la nafta en los automóviles (antidetonaante), humo de cigarrillos y otras fuentes (Minciullo y col. 2014). Entre las fuentes de exposición industrial figuran la producción de benceno, su uso en síntesis química, el uso de productos del petróleo o sus usos como solvente (Minciullo y col. 2014)

Ambos hidrocarburos se encuentran en el medio ambiente, principalmente debido a la contaminación producida por las emisiones de los automóviles, el humo del cigarrillo y la descarga inadecuada de efluentes de la actividad industrial. Es importante destacar que el benceno ha sido clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en el Grupo 1 (carcinógeno comprobado en humanos). Por lo tanto, su uso en el lugar de trabajo como solvente, ha sido fuertemente restringido en las naciones occidentales (WHO 1993). Sin embargo, el tolueno, a pesar de su reconocida toxicidad para el sistema nervioso central, aún se sigue utilizando en el ámbito laboral industrial y domosanitario (Lovreglio y col. 2010).

Para ambos hidrocarburos, la principal vía de absorción es la inhalatoria. La biotransformación es principalmente hepática, mediado por el complejo microsomal hepático citocromo P450 (CYP). El benceno se metaboliza a fenol, ácido *trans, trans*-mucónico (*t, t*-MA, por sus siglas en inglés) y ácido S-fenilmercaptúrico; y el tolueno a ácido hipúrico, ácido S-bencilmercaptúrico, *para* y *orto*-cresol (oCre). Finalmente, los distintos metabolitos se excretan por orina (Lovreglio y col. 2010).

En el Conurbano Bonaerense, en la periferia de los polos industriales, hay un gran número de viviendas con considerable población expuesta a distintos tóxicos o xenobióticos presentes en el medioambiente, productos de la actividad industrial (Nápoli 2009; ACUMAR 2017).

Los niños son una población vulnerable a los efectos tóxicos de los contaminantes. Estos tó-

xicos, a concentraciones inferiores a las descritas como nocivas para los adultos, pueden tener efectos nocivos en un niño si la exposición ocurre durante una etapa de vulnerabilidad biológica, y sus efectos adversos podrían manifestarse más adelante en la vida (Pelallo-Martinez y col. 2014).

En consecuencia, es necesario realizar el monitoreo biológico de los biomarcadores de exposición (BE) para estos tóxicos. Los BE que actualmente se emplean para vigilar la exposición al benceno y al tolueno son, respectivamente, el *t, t*-MA urinario (Ruppert y col. 1997; Weaver y col. 2000; Jalai y col. 2017) y el oCre urinario (Truchon y col. 1999; Cosnier y col. 2013). Si bien los BE, fenol y ácido S-fenilmercaptúrico urinarios, proporcionan evidencia altamente confiable de la exposición al benceno incluso a niveles muy bajos en el aire, tienen como principal inconveniente la necesidad de realizar procedimientos analíticos complejos para alcanzar la sensibilidad analítica necesaria (Marrubini y col. 2002).

El objetivo del presente trabajo fue analizar los resultados de los niveles de *t, t*-MA y oCre en orina en una población infanto-juvenil residente en Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense potencialmente expuesta a benceno y tolueno ambiental.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo sobre los resultados de *t, t*-MA y oCre urinarios realizados en el laboratorio durante el período comprendido entre los años 2011-2017. De las 1519 muestras de orina ingresadas, 1519 fueron para determinar *t, t*-MA y 1447 para oCre.

Para el análisis se consideraron: el resultado cuantitativo, la edad y el lugar de procedencia de los pacientes.

### Análisis cuantitativos

#### *t, t*-MA

Se realizó la extracción en fase sólida de la orina (utilizando columnas Bond Elut-SAX, Agilent). El extracto se inyectó en un cromatógrafo líquido (UFLC) Shimadzu XR 20A con detector de arreglo de diodos. El área del pico se interpoló en una curva de calibración cuyo rango fue de 50 a 1000 µg/l. Las muestras cuyas áreas superaron el valor máximo de la curva de calibración, fueron reprocesadas realizando una dilución con agua destilada. Los límites de detección y cuantificación fueron 25 y 50 µg/l, respectivamente.

### oCre

Se realizó una hidrólisis ácida de la orina y luego una extracción líquido-líquido. Para la cuantificación se utilizó un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890, con detector de ionización por llama. El área del pico se interpoló en una curva de calibración cuyo rango fue de 0,20 a 3,0 mg/l. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,10 y 0,20 mg/l, respectivamente.

### Creatinina

La cuantificación de creatinina urinaria se realizó por el método de Jaffé en un autoanalizador Cobas 511-Roche. Los resultados se expresaron en g/l. El rango de aceptación de las orinas para su procesamiento fue de 0,3 a 3 g/l de creatinina (WHO 1996; Barr y col. 2005; Fustinoni y col. 2007)

### Crterios aplicados al análisis de resultados $t$ , $t$ -MA

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/l}$  y en  $\mu\text{g/g}$  de creatinina. Para cada forma de expresión de resultados se consideraron las siguientes categorías de análisis: hasta 50, entre 50 y 500 y mayor de 500 (expresados en  $\mu\text{g/l}$ ), y entre 15-163 y mayores de 163 (expresados en  $\mu\text{g/g}$  creatinina). Los valores de corte utilizados para las categorías de análisis se construyeron con el límite de cuantificación (50  $\mu\text{g/l}$ ) y los valores de referencia (VR) para población adulta no expuesta ocupacionalmente: 100–500  $\mu\text{g/l}$  (Lauwerys y Hoet 1993) y 15-163  $\mu\text{g/g}$  creatinina (Aprea y col.2008).

### oCre

Los resultados se expresaron en mg/l y mg/g de creatinina. Para el análisis de resultados se consideraron las siguientes categorías: menor de 0,20, entre 0,20 y 0,50 y mayor de 0,50 (expresados en mg/l), y menor de 0,30 y mayor o igual a 0,30 (expresados en mg/g creatinina). Estas categorías se construyeron entre el límite de cuantificación (0,20 mg/l) y el Índice Biológico de Exposición (BEI por sus siglas en inglés) para una población expuesta ocupacionalmente (0,50 mg/l) (Fustinoni y col. 2007; Lovreglio y col. 2010) y con el VR menor a 0,30 mg/g creatinina para población no expuesta ocupacionalmente (LaDou 2005).

### Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se calcularon los siguientes estadísticos muestrales: media, mediana, desvío estándar, mínimo y máximo

(Funciones estadísticas, Microsoft Excel Versión 2007).

### Resultados

Del total de muestras de orina recibidas, 56 presentaron valores de creatinina por fuera del rango de aceptación en consecuencia, éstas muestras no fueron procesadas.

El rango etario de la población estuvo comprendido entre 0 y 19 años. La edad promedio de los pacientes fue de 4,8 años y la mediana 4,6 años.

Los pacientes residían en Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C.A.B.A.) y el Conurbano Bonaerense y se encontraban potencialmente expuestos a los solventes en forma ambiental y crónica. La procedencia fue, principalmente, de Lomas de Zamora (32%), seguida por Avellaneda (29%) y C.A.B.A. (20%) (Figura 1).

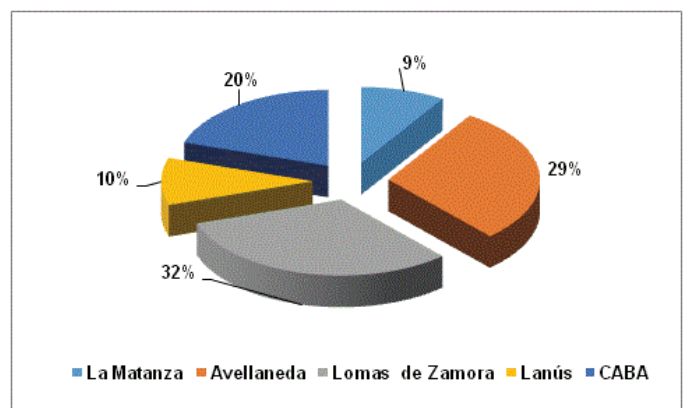
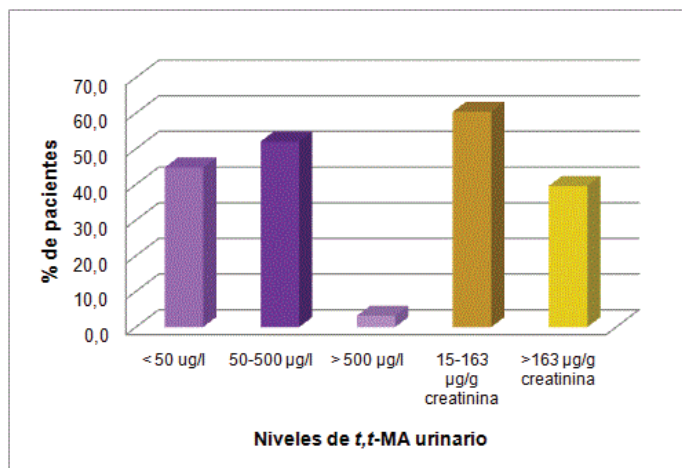


Figura 1. Distribución de los resultados según el lugar de residencia de los pacientes.

Las concentraciones de  $t$ ,  $t$ -MA en las orinas efectivamente analizadas ( $n=1463$ ) fueron: menor de 50  $\mu\text{g/l}$  ( $n=655$ , 44,8%); entre 50-500  $\mu\text{g/l}$  ( $n=762$ , 52,1%) y mayor de 500  $\mu\text{g/l}$  ( $n=46$ , 3,1%). Expresadas por gramo de creatinina: entre 15-163  $\mu\text{g/g}$  creatinina ( $n=488$ , 60,4%) y mayor de 163  $\mu\text{g/g}$  creatinina ( $n=320$ , 39,6%) (Figura 2). En la tabla 1 se observan los estadísticos muestrales calculados para  $t$ ,  $t$ -MA urinario (expresados en  $\mu\text{g/l}$  y  $\mu\text{g/g}$  creatinina) basados en los 808 resultados efectivamente cuantificables. Como se muestra en la tabla 2, el mayor porcentaje de los pacientes que presentaron niveles de  $t$ ,  $t$ -MA por encima de los VR (expresados tanto en  $\mu\text{g/l}$  como en  $\mu\text{g/g}$  creatinina) residían en Lomas de Zamora al momento del análisis. Sin embargo, Avellaneda concentró la población que presentó los niveles

más altos de *t*, *t*-MA, con una mediana de 850 µg/l y 308 µg/g creatinina, incluyendo el máximo nivel de 4024 µg/l y 3168 µg/g creatinina que correspondió a un niño de 5 años.



**Figura 2.** Porcentaje de pacientes en función de los niveles urinarios de *t*, *t*-MA según se expresen en µg/l o µg/g de creatinina.

**Tabla 1.** Estadísticos de *t*, *t*-MA urinario, expresados en µg/l y µg/g creatinina.

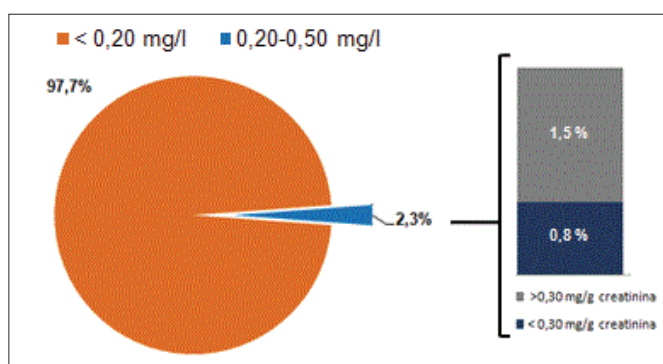
	<i>t</i> , <i>t</i> -MA urinario	
	µg/l	µg/g creatinina
n	808	808
Media	187	204
Mediana	114	133
Desvío estándar	257	230
Mínimo	50	24
Máximo	4024	3168

n: número de muestras efectivamente cuantificadas

**Tabla 2.** Distribución de resultados que superaron el valor de referencia (expresados en µg/l y en µg/g creatinina), según el lugar de procedencia de los pacientes.

Localidad \ <i>t</i> , <i>t</i> -MA urinario	N (%)	
	> 500 µg/l	> 163 µg/g creatinina
Avellaneda	14 (30,4)	77 (24,1)
CABA	4 (8,7)	59 (18,4)
La Matanza	0 (0)	55 (17,2)
Lanús	6 (13,1)	31 (9,7)
Lomas de Zamora	22 (47,8)	98 (30,6)
Totales	46 (100)	320 (100)

Las concentraciones de oCre en las muestras efectivamente analizadas (n=1391) fueron: menor de 0,20 mg/l (n=1359, 97,7%) y entre 0,20-0,50 mg/l (n=32, 2,3%). Ningún resultado superó los 0,50 mg/l. Expresadas por gramo de creatinina fueron: menor de 0,30 mg/g creatinina (n=11, 0,8%), mayor o igual a 0,30 mg/g creatinina (n=21, 1,5%) (Figura 3). En la tabla 3 se presentan los estadísticos muestrales calculados para oCre urinario (expresados en mg/l y mg/g creatinina) basados en los 32 resultados efectivamente cuantificables.



**Figura 3.** Porcentaje de pacientes en función de los niveles urinarios de oCre según se expresen en mg/l o mg/g de creatinina.

**Tabla 3.** Estadísticos de oCre urinario, expresado en mg/l y mg/g creatinina.

	oCre	
	mg/l	mg/g creatinina
n	32	32
Media	0,31	0,38
Mediana	0,30	0,36
Desvío estándar	0,08	0,16
Mínimo	0,20	0,14
Máximo	0,48	0,87

n: número de muestras efectivamente cuantificadas

**Tabla 4.** Distribución de resultados, expresados en mg/l y en mg/g creatinina, según el lugar de procedencia de los pacientes.

Localidad \ oCre urinario	N (%)	
	>0,50 mg/l	≥0,30 mg/g creatinina
Avellaneda	0 (0)	7 (33,3)
C.A.B.A.	0 (0)	5 (23,8)
La Matanza	0 (0)	5 (23,8)
Lomas de Zamora	0 (0)	1 (4,8)
Sin datos	0 (0)	3 (14,3)
Totales	0 (0)	21 (100)



La *tabla 4* muestra la cantidad (y porcentaje) de resultados expresado en mg/g creatinina según su lugar de residencia al momento del análisis. El mayor porcentaje de estos pacientes residían en Avellaneda y de 3 (14,3%) de ellos no se dispuso de datos sobre lugar de residencia. Sin embargo, La Matanza concentró la población que presentó los niveles más altos de oCre con una mediana de 0,52 mg/g creatinina. El nivel más alto fue de 0,87 mg/g creatinina en un niño de 5,5 años que residía en Avellaneda.

### Discusión

La exposición crónica a hidrocarburos puede dar lugar a una amplia gama de patologías, como trastornos neurológicos (tolueno) y aplasia medular (benceno) (Lovreglio y col. 2010; Weisel 2010; Cosnier y col. 2013). Los niños pueden estar expuestos al benceno y tolueno ambientales y/o como fumadores pasivos (Bahrami. y Edwards 2005; Fustinoni y col. 2007; Protano y col. 2012).

El oCre puede considerarse un buen biomarcador de exposición al tolueno, en concentraciones ambientales por debajo de 50 ppm (Truchon y col. 1999). El *t, t*-MA es un biomarcador potencialmente válido en el ámbito laboral y ambiental para exposiciones a benceno en concentraciones ambientales por debajo de 0,1 ppm (Weisel 2010).

Se debe tener en cuenta que la concentración urinaria de un metabolito depende en gran medida de la tasa de producción de orina. Las muestras de orina muy diluidas o demasiado concentradas pueden llevar a una medición e interpretación errónea de los resultados de los biomarcadores (WHO 1996). La recomendación es usar la concentración urinaria de creatinina en busca de una dilución o concentración excesivas y para excluir muestras fuera del rango aceptable ( $0,3 \text{ g/l} \leq \text{creatinina} \leq 3,0 \text{ g/l}$ ) (WHO 1996; Barr y col. 2005; Fustinoni y col. 2007). Por este motivo, 56 orinas fueron excluidas de la cuantificación de biomarcadores.

Diferentes autores (Weaver y col. 1996; Amodio-Cocchieri y col. 2001; Bahrami. y Edwards 2005; Protano y col. 2012) han determinado *t, t*-MA urinario en poblaciones infanto-juveniles siendo los rangos de edad de los grupos en estudio variable (entre 1,7 -14 años). En el presente trabajo, la población estudiada estuvo comprendida entre 0 y 19 años siendo la edad promedio de 4,8 años y la mediana 4,6 años.

Además, algunos autores (Amodio-Cocchieri y col. 2001; Bahrami. y Edwards 2005) encontra-

ron diferencias en los valores de *t, t*-MA urinario entre población urbana y rural. La población incluida en este estudio fue de zona urbana, en su mayoría de localidades pertenecientes al Conurbano Bonaerense.

En concordancia con los resultados de este estudio, otros autores reportaron gran variabilidad en los niveles urinarios de *t, t*-MA (expresados tanto en  $\mu\text{g/l}$  o  $\mu\text{g/g}$  creatinina) de poblaciones infanto-juveniles (Weaver y col. 1996; Amodio-Cocchieri y col. 2001; Bahrami y Edwards 2005; Protano y col. 2012). Weaver y col. (1996) informaron niveles medios de *t, t*-MA urinarios de  $144,5 \pm 296,1 \text{ ng/ml}$  (rango 8-2001,2 ng/ml) y *t, t*-MA/creatinina de  $176,6 \pm 341,7 \text{ ng/mg}$  (rango 7,1-2579,2 ng/mg). Nuestro estudio mostró similares niveles promedio de *t, t*-MA urinario. Sin embargo, los valores mínimos y máximos encontrados resultaron muy superiores a los reportados por Weaver y col. (1996).

Weaver y col. (1996), así como Amodio-Cocchieri y col. (2001), encontraron que 6 y 3 niños participantes, respectivamente, presentaron valores superiores a  $500 \mu\text{g/l}$  de *t, t*-MA urinario. Los autores concluyeron que estos valores son más consistentes con una exposición ocupacional que ambiental. En un estudio realizado entre los años 2004 y 2006, Olmos y col. (2006) cuantificaron el *t, t*-MA urinario, en una población infantil de una zona urbano-industrial de la localidad de Avellaneda, provincia de Buenos Aires. El *t, t*-MA promedio fue de  $85,6 \pm 203,4 \mu\text{g/g}$  creatinina (rango: 48,6-1367,8  $\mu\text{g/g}$  creatinina). Más de una década después, y de acuerdo a los resultados de este estudio, podría decirse que los valores medios y máximos de este biomarcador mostraron un importante aumento.

En el presente trabajo el 3,1% de los pacientes presentaron niveles de *t, t*-MA mayores a  $500 \mu\text{g/l}$ . Sin embargo, los resultados ajustados por creatinina mostraron que el 39,6% de los niveles de *t, t*-MA urinario se encontraron por encima del valor de referencia establecido por Aprea y col. (2008).

El *t, t*-MA no es específico como biomarcador de exposición al benceno, debido a que también es producto del metabolismo del ácido sórbico (Ruppert y col. 1997; Pezzagno y col. 1999; Weaver y col. 2000; Sanguinetti y col. 2000; Marrubini y col. 2002). El sorbato es un aditivo alimentario que se encuentra en muchos alimentos de consumo diario: quesos untables, mermeladas, salsas, enlatados, bebidas (sobre todo aguas saborizadas y jugos para diluir), y

también está presente naturalmente en frutas y verduras. Por lo tanto, los valores encontrados en nuestra población podrían estar influenciados por el sorbato dietario.

El humo de tabaco es una de las principales fuentes de exposición al benceno en interiores (Bahrami y Edwards 2005, Chakroun y col. 2009). Bahrami y Edwards (2005) encontraron diferencias significativas en los niveles de *t*, *t*-MA urinario entre los niños cuyos padres eran fumadores y los niños cuyos padres no lo eran. En otro estudio (Chakroun y col. 2009) se observó una tendencia a aumentar las concentraciones urinarias de *t*, *t*-MA en fumadores en comparación con los no fumadores.

En consecuencia, la considerable variabilidad en las concentraciones urinarias de *t*, *t*-MA en niños (Amodio-Cocchieri y col. 2001) podría explicarse por factores de confusión distintos del medio ambiente, como la ingesta de ácido sórbico dietario, la exposición al humo de tabaco (fumador pasivo) y diferencias en la tasa de excreción renal (que se discute más adelante).

En relación al tolueno se considera que, también, el humo del cigarrillo es una posible fuente dado el aumento significativo en el *o*Cre urinario observado en fumadores en comparación con los no fumadores (Fustinoni y col., 2007).

El análisis de los resultados de *o*Cre mostró que el 97,7% (n=1359) tuvo niveles urinarios no cuantificables y el 2,3% restante entre 0,20-0,50 mg/l, valores por debajo del BEI. Un bajo porcentaje de la población estudiada presentó niveles superiores a 0,30 mg/g creatinina, valor límite de referencia para población no expuesta laboralmente (LaDou 2005). En este caso, se utilizó el BEI al no disponer (en bibliografía) de un valor de referencia expresado en mg/l para población ambientalmente expuesta. Tampoco se encontraron trabajos que presentaran niveles de *o*Cre urinario en casos de exposición ambiental que permitan realizar comparaciones en cuanto a niveles alcanzados en orina.

En este trabajo se observaron diferencias en la proporción de pacientes que superaron el valor de referencia según se utilizara el biomarcador expresado por litro o por gramo de creatinina. En general, el ajuste por creatinina se aplica para normalizar el analito en el caso de disponer de micciones aisladas como muestras para el análisis. Este enfoque funciona bien para el análisis de la exposición ocupacional si el analito a cuantificar se comporta de manera similar a la creatinina en el riñón (Barr y col. 2005). La tasa de excreción de orina, en especial en la infancia,

varía (inter e intra individuos) dependiendo de la cantidad y el tipo de líquido ingerido en el transcurso de un día, género, edad y actividad física (Weisel 2010, Protano y col. 2012). Estos factores no están relacionados con las concentraciones de metabolitos, pero sí con los niveles de creatinina urinaria (Protano y col. 2012). Algunos investigadores corrigen las concentraciones urinarias comparando los niveles de metabolitos con la cantidad de creatinina excretada aunque otros han sugerido que la concentración sin corregir es la mejor métrica para informar, ya que la tasa de excreción de creatinina no es constante en personas activas en el transcurso de un día (Barr y col. 2005, Weisel 2010).

En resumen, este trabajo analizó los resultados cuantitativos de *t*, *t*-MA y *o*Cre urinarios en un considerable número de pacientes infantojuveniles (más de 1000 pacientes), aportando datos e información de habitantes potencialmente expuestos a benceno y tolueno en forma ambiental.

Los resultados del trabajo podrían indicar una contaminación ambiental persistente, en especial en el Conurbano Bonaerense, donde debería continuarse el monitoreo de algunas zonas, sobre todo en el caso del benceno donde se observaron mayor proporción de sujetos potencialmente expuestos respecto a resultados obtenidos en años anteriores.

Esto se ve reflejado en la cantidad de individuos que superaron los valores de referencia en cada caso. Pero, por otro lado, es de vital importancia tener en cuenta los factores de confusión, tales como el aporte dietario, la exposición al humo de tabaco ambiental (fumador pasivo) y la tasa de excreción renal que llevarían a una sobre-estimación de los resultados y a una incorrecta toma de decisiones.

## Bibliografía

Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR). Estado del agua superficial, subterránea y calidad de aire. 2017. Informe Trimestral Abril-Junio 2017.

Amodio-Cocchieri R., Del Prete U., Cirillo T., Agozzino E., Scarano G. Evaluation of Benzene Exposure in Children living in Campania (Italy) by Urinary *trans*, *trans*-Muconic Acid Assay. J Toxicol Environ Health. 2001;63(A):79-87.

Aprea C., Sciarra G., Bozzi N., Pagliantini M., Perico A., Bavazzano P., Leandri A., Carrieri M., Scapellato M.L., Bettinelli M., Bartolucci G.B.

Reference Values of Urinary *Trans, trans*-muconic Acid: Italian Multicentric Study. Arch Environ Contam Toxicol. 2008;55:329-340.

Bahrami A., Edwards J. Determination of *trans, trans*-muconic acid in Children living in Adelaide Based on HPLC Developed Method. Pak. J BiolSci. 2005; 8(12):1703-1706.

Barr D.B, Wilder L.C., Caudill S.P., Gonzalez A.J., Needham L.L., Pirkle J.L. Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. Environ Health Perspect. 2005;113(2):192-200.

Chakroun R., Faidi F., Hedhili A., Kolsi M., Fehri S., Nouaigui H. Determination of urinary *trans,trans*-muconic acid reference values in the general Tunisian population. Ann Biol Clin. 2009;67(2):163-9.

Cosnier F., Cossec B., Burgart M., Nunge H., Brochard C., Décret M.J., Rémy A. Biomarkers of toluene exposure in rats: mercapturic acids versus traditional indicators (urinary hippuric acid and *o*-cresol and blood toluene). Xenobiotica. 2013;43(8):651-660.

Cruz S.L, Rivera-García M.T., Woodward J.J. Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. Drug Alcohol Res. 2014;3:1-8

Fustinoni S., Mercadante R., Campo L., Scibetta L., Valla C., Consonni D., Foà V. Comparison between urinary *o*-cresol and toluene as biomarkers of toluene exposure. J Occup Environ Hyg. 2007;4(1):1-9.

Jalai A., Ramezani Z., Ebrahim K. Urinary *trans, trans*-muconic acid is not a reliable biomarker for low-level environmental and occupational benzene exposures. Saf Health Work. 2017;8:220-225.

LaDou J. Diagnóstico y tratamiento en medicina laboral y ambiental. 3º edición. México: Editorial Manuel Moderno; 2005.

Lauwerys R.R., Hoet P. Biological monitoring of exposure to organic substances. Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. 2<sup>nd</sup> edition. London: Lewis Publishers; 1993.

Lovreglio P., Barbieri A., Carrieri M., Sabatini L., Fracasso M.E., Doria D., Drago I., Basso A., D'Errico M.N., Bartolucci G.B., Violante F.S., Soleo L. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. Int Arch Occup Environ Health. 2010;83:341-356.

Marrubini G., Coccini T., Maestri L., Manzo L. Effect of sorbic acid administration on urinary *trans, trans*-muconic acid excretion in rats exposed to low levels of benzene. Food Chem Toxicol. 2002;40:1799-1806.

Minciullo P.L., Navarra M., Calapai G., Gangemi S. Cytokine Network Involvement in Subjects Exposed to Benzene. J Immunol Res.2014,1-8.

Ministerio de Salud-Presidencia de Nación. Intoxicaciones e Indicadores de Efecto y Exposición a Agentes Tóxicos. Normativa y Tutorial para la vigilancia a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud-SNVS (C2 y SIVILA). Actualización 2014. p 40.

Nápoli A.M. Una política de Estado para el Riachuelo. Informe Ambiental Anual. Fundación Ambiente y Recursos Naturales: Buenos Aires; 2009.

Pezzagno G., Maestri L., Fiorentino M.L. *Trans, trans*-muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: some aspects of its specificity. Am J Ind Med. 1999;35:511-518.

Protano C., Andreoli R., Manini P., Vitali M. Urinary *trans, trans*-muconic acid and *S*-phenylmercapturic acid are indicative of exposure to urban benzene pollution during childhood. Science of the Total Environment. 2012;435-436:115-123.

Ruppert T., Scherer G., Tricker A.R., Adlkofer F. *trans, trans*-Muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. Int Arch Occup Environ Health. 1997;69:247-251.

Sanguinetti G., Accorsi A., Barbieri A., Raffi G.B., Violante F.S. Failure of urinary *trans, trans*-muconic acid as a biomarker for indoor environmental benzene exposure at ppb levels. J Toxicol Environ Health. 2001;63(A):599-604.

Truchon G., Tardif R., Brodeur J. o-Cresol: A Good Indicator of Exposure to Low Levels of Toluene. *Applied Occup Environ Hyg.* 1999;14(10):677-681.

Weaver V.M., Davoli C.T., Helter P.J., Fitzwilliam A., Peters H.L., Sunyer J. Murphy S.E., Goldstein G.W., Groopman J.D. Benzene Exposure, Assessed by Urinary *trans, trans*-Muconic Acid, in Urban Children with Elevated Blood Lead Levels. *Environ Health Perspectives.* 1996;104(3):318-323.

Weaver V.M., Buckley T., Groopman J.D. Lack of Specificity of *trans, trans*-Muconic Acid as a Benzene Biomarker after Ingestion of Sorbic Acid-preserved Foods. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:749-755.

Weisel C.P. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact.* 2010;184:58-66.

World Health Organization (WHO). *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace Guidelines.* Volume 1. Ginebra, Suiza; 1996. p 300

## Toxic, cytotoxic and genotoxic potential of synthetics food flavorings Potencial tóxico, citotóxico y genotóxico de saborizantes sintéticos de alimentos

Barros Rocha, Romário; Peron, Ana Paula\*; Silva Santos, Fabelina Karollyne; Mendes Marques, Márcia Maria; Silva Sousa, Maria Eduarda; de Oliveira, Valtânia Ana; do Nascimento, Andressa Larissa

Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LaCM). Curso de Ciências Biológicas. Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB), Universidade Federal do Piauí (UFPI). Rua Cícero Duarte, 940. 64600-000. Picos, Piauí, Brazil.

\*anapaulaperon@ufpi.edu.br

Recibido: 21 de junio de 2018

Aceptado: 10 de septiembre de 2018

**Abstract.** Food flavorings in general are few studied for the toxicological aspect. This condition justifies toxicity, cytotoxicity and genotoxicity assessments of the substances. In the present study, the toxicity of banana, cherry and hazelnut flavorings was evaluated in meristematic cells of roots of *Allium cepa*, in pure form (as marketed) and in the concentrations of 12.5; 25 and 50%, after 24 and 48 hours of exposure. Toxic potential of these food additives was also evaluated against *Artemia salina* nauplii at concentrations of 0.78; 1.56; 3.12; 6.25; 12.5; 25 and 50%, after 24 hours of exposure. The three additives, in all treatments and times of analysis considered, caused significant inhibition of cell division in *A. cepa*, however did not cause cellular alterations to the evaluated meristems. These food flavorings also caused significant mortality to micro crustaceans with  $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ . From this, under the conditions of mentioned analyzes, cherry, banana and hazelnut flavorings induced significant toxicity and cytotoxicity to the bioassays used.

**Keywords:** Aroma and flavor; Potential toxicity; *Allium cepa*; *Artemia salina*.

**Resumen.** En general, los aspectos toxicológicos de los saborizantes de los alimentos son poco estudiados. Esta condición justifica las evaluaciones de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad de estas sustancias. En el presente estudio, se evaluó la toxicidad de los aromas de plátano, cereza y avellana en células meristemáticas de raíces de *Allium cepa*, en forma pura (según comercializa) y en concentraciones de 12.5; 25 y 50%, después de 24 y 48 horas de exposición. El potencial tóxico de estos aditivos alimentarios también se evaluó frente a nauplios de *Artemia salina* a concentraciones de 0,78; 1,56; 3.12; 6.25; 12.5; 25 y 50%, después de 24 horas de exposición. Los tres aditivos, en todos los tratamientos y tiempos de análisis considerados, causaron inhibición significativa de la división celular en *A. cepa*, sin embargo, no causaron alteraciones celulares a los meristemas evaluados. Estos saborizantes alimentarios también causaron una mortalidad significativa a microcrustáceos con  $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ . A partir de esto, bajo las condiciones de los análisis descriptos, los aromatizantes de cereza, plátano y avellana indujeron toxicidad significativa y citotoxicidad para los bioensayos utilizados.

**Palabras clave:** Aroma y sabor; Potencial tóxico; *Allium cepa*; *Artemia salina*.

### Introduction

Food additives or micro-ingredients have become mandatory in modern food, mainly because of their ability to maintain a long-time quality of food marketed in supermarkets (Xu *et al.* 2013; Sales *et al.* 2017). Among these substances, aroma and flavor additives are of particular relevance because they give or enhance aroma and flavor to the most varied types of processed foods (Adami and Condi 2016).

The aroma and flavor additives substances have a complex chemical composition, consisting of diluents, antioxidants, defoamers, preservatives, emulsifiers, stabilizers, acidity regulators, flavor enhancers, anti-wetting agents, anti-cak-

ing agents, dyes and extraction and processing solvents (Xu *et al.* 2013; Sales *et al.* 2017). The chemical formulation of the semicro-ingredients is approved for use worldwide by the Flavor Extract Manufacturers Association (FEMA), Food and Agriculture Organization (FAO) and in Brazil, by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2007; Carvalho *et al.* 2017). According to the Codex Alimentarius (2009), the general chemical formulation of flavor and flavor additives are standardized worldwide.

Although authorized, most of the flavorings used in the industry do not have established

Acceptable Daily Intake (ADI), since so far there are few surveys of toxicological assessments on these food additives (Xu *et al.* 2013; Koca *et al.* 2015; Moura *et al.* 2016). Thus, it is relevant to carry out studies that determine the toxic, cytotoxic and genotoxic potential of flavor micro-ingredients (Koca *et al.* 2015; Sales *et al.* 2017). In this way pointed out that the toxicological evaluation, at systemic and cellular levels, of these additives is extremely important in terms of promoting food security of the population and providing a basis for the development or modification of food security strategies of surveillance agencies (Moura *et al.* 2016).

The root meristematic zone of *Allium cepa* L. (onion) is an efficient test organism for the evaluation of toxicity at cellular level (Herrero *et al.* 2012). This organism has excellent kinetic properties of proliferation, large chromosomes in reduced number ( $2n = 16$ ), which facilitates the detection of chromosomal aberrations and abnormalities in the mitotic spindle (Tabrez *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2013). It also allows the verification of changes in cell division or mitotic index when exposed to chemical compounds with potential cytotoxic action (Neves *et al.* 2014). *A. cepa* system is very effective for initial assessment of cytotoxicity and genotoxicity of chemical compounds or for validation of these conditions after conducting research in other bioassays (Neves *et al.* 2014; Marques *et al.* 2015).

Another relevant test organism for the initial assessment of the toxicity of chemical compounds is *Artemia salina* (Anostraca) (Rosa *et al.* 2016). Nauplii of this species are used as biological test to evaluate the toxic potential of useful natural and/or synthetic substances (Paredes *et al.*, 2016). The lethality of this organism has been used to identify biological responses, in which variables such as death or life are the only ones involved (Meyer *et al.* 1982; Paredes *et al.* 2016).

Thus, the present study aimed to evaluate, through different treatments or concentrations, the toxic, cytotoxic and genotoxic potentials of synthetic flavoring additives of cherry, banana and hazelnut, to the root meristem cells of *A. cepa*, in *Vero* cells and *A. salina* nauplii. These flavorings were chosen for analysis because they are widely used in the food industry in the preparation of processed sweet foods, and there is no scientific literature evaluating the toxicity of these flavorings.

## Material and methods

### *Obtaining flavorings and determination of treatments for toxicity assessment*

Aroma and flavor additives, nature identical synthetic, commercially available in non-greasy liquid form of cherry, banana and hazelnut were obtained from a food additive manufacturing industry located in the city of São Paulo, State of São Paulo, Brazil, specialized in the domestic and international marketing of food additives.

In the test *A. cepa*, the roots of the bulbs were exposed to each flavoring from the following treatments: pure flavoring (without dilution) and flavoring dissolved in distilled water in the concentrations of 12.5; 25 and 50%. In the tests MTT and *A. salina*, the following treatments were established: pure flavoring (without dilution) and flavoring diluted in aqueous solution of synthetic sea salt (30 g/L) at concentrations of 0.78; 1.56; 3.12; 6.25; 12.5; 25 and 50%.

### *Cytotoxicity and genotoxicity test in root meristem cells of Allium cepa L*

For the evaluation of the flavorings in root meristems, initially, onion bulbs were placed in aerated flasks with distilled water to obtain 2.0 cm long roots. For the analysis of the all treatment, an experimental group with five onion bulbs was established. Before placing the roots in contact with their respective treatments, some roots were collected and fixed to serve as control of the bulb itself, which was identified as analysis time 0 hour (0 h). Then, the remaining roots were placed in their respective treatments for 24 and 48 hours, procedures called exposure times 24 and 48 h, where root collection was performed every 24 hours. A negative control was prepared only with distilled water, in which roots were also collected at 0, 24 and 48 h. All roots collected during the experiment were fixed in Carnoy 3:1 (ethanol:acetic acid) for up to 24 hours.

Slides were mounted according to the protocol proposed by Guerra and Souza (2002), and analyzed under an optical microscope with a 40x objective. For each bulb, 1,000 cells were analyzed, totaling 5,000 cells for each control group (0 h), 24 h exposure time group and 48 h exposure time group. Cells were counted in interphase and during cell division, and the mitotic index was calculated, thus determining the cytotoxic potential. Genotoxicity was evaluated through micronuclei frequency, and aneugenic or mitotic spindle alterations were evaluated through the frequency of colchicine

metaphases, anaphase and telophase bridges, gene amplifications, cells with adhesion, nuclear buds and multipolar anaphases. The results of cytotoxicity and genotoxicity were analyzed by the Chi-square test ( $\chi^2$ ) at 5%.

#### Toxicity test in nauplii of *Artemia salina* Leach

The toxicity test of aroma and flavor additives against *A. salina* was carried out according to the protocol proposed by Meyer *et al.* (1982) and Paredes *et al.* (2016). *A. salina* eggs were incubated in solution of synthetic sea salt (30 g/L) in a glass vessel equipped with a dark compartment and another with artificial light. The water was maintained at room temperature under constant stirring and aeration for 48 hours until hatching of the larvae.

With the aid of a Pasteur pipette, the larvae or micro crustacean nauplii ( $n = 10$ ) were transferred to test tubes containing 3 mL of each treatment. Flavorings concentrations were prepared in saline water ranging from 1000 to 7.81

$\mu\text{g/mL}$ . The control was prepared only with solution of synthetic sea salt (30 g/L). All treatments were analyzed in triplicate, and the number of dead larvae was counted after 24 hours of exposure.

#### Results and discussion

Based on the results in *Table 1*, the mitotic indices obtained for the root meristem cells of *A. cepa* exposed to cherry, banana and hazelnut flavorings, in pure form and in the three concentrations analyzed, at 24 and 48 h exposure, were significantly lower than the observed cell division indices for their respective 0 h exposure time. Furthermore, the cell division indices for the 24 and 48 h exposure times of all treatments also demonstrated significant inhibition of cell division to the meristematic tissue when compared to the mitotic index obtained for the negative distilled water related to the same exposure times. The concentrations evaluated were not genotoxic in the *A. cepa*.

**Table 1.** Mitotic indices (IM%) observed in root meristem tissue of *Allium cepa* exposed at 0, 24 and 48 hours exposed to distilled water (control negative) and to different treatments or concentrations of cherry, banana and hazelnut flavorings for evaluation of cytotoxicity.

Treatments	Concentration	IM%(0 h)	IM%(24 h)	IM%(48 h)
Negative control		41.9a	41.7a	41.3a
	pure	42.1a	4.5b*	1.3 b*
	50%	40.9 <sup>a</sup>	4.1b*	1.1b*
Cherry flavoring	25%	39.9 <sup>a</sup>	4.7b*	2.1b*
	12.5%	40.1 <sup>a</sup>	5.0b*	2.8b*
	pure	48.1 <sup>a</sup>	3.9b*	2.2b*
Banana flavoring	50%	37.2 <sup>a</sup>	3.1b*	1.8b*
	25%	41.1 <sup>a</sup>	4.0b*	2.3b*
	12.5%	38.9 <sup>a</sup>	3.9b*	1.8b*
Hazelnut flavoring	pure	47.3 <sup>a</sup>	5.4b*	5.1b*
	50%	43.0 <sup>a</sup>	7.3b*	6.1b*
	25%	49.0 <sup>a</sup>	7.7b*	5.9b*
	12.5%	41.2 <sup>a</sup>	7.0b*	7.1b*

TIM: Mitotic Index. Different letters between the exposure times, in each concentration of a flavoring, shows that the obtained mitotic indices differ from each other ( $p < 0.05$ ). \*means that the mitotic indices obtained at each concentration differ from the mitotic indices obtained for the negative control, considering the same exposure time ( $p < 0.05$ ).

A significant decrease in mitotic index, as observed in *Table 1*, is indicative of high cytotoxicity of the test substance. As mentioned by Herrero *et al.* (2012) and Türkoğlu (2007), mitotic indices significantly lower than the control in-

dices, such as those observed in the present study for cherry, banana and hazelnut, indicate the presence of agents whose toxic action impairs the growth and development of exposed organisms. In addition, these authors state that

the inhibition of cell proliferation triggered by cytotoxic compounds in tissues of intense cellular proliferation and normal performance, as used in this research is very harmful to the organism by inhibiting or limiting the replacement of cells, altering the production of proteins and result in dysfunction of the organ where it is located. Such losses, according to Valavanidis *et al.* (2013) and Zilifdar *et al.* (2014) can significantly compromise the cellular division of the affected tissue or organ and trigger and/or potentiate cancerous processes.

In relation to the condition of the flavorings have shown cytotoxic but not genotoxic potential to *A. cepa*, it is important consider to the principle of the cell cycle is the formation of identical cells, the production of new cells with significant changes in structure and/or chromosome

number make cell functioning unfeasible and tend to be eliminated from tissues with normal performance, which may lead to a significant antiproliferative effect (Marques *et al.* 2015; Sales *et al.* 2017).

In the evaluation of toxicity of cherry, banana and hazelnut food flavorings against nauplii of *A. salina* are given in Table 2. The results revealed that all the samples tested showed high toxicity ( $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) against *A. salina*, according with Paredes *et al.* (2016). Cherry was the most toxic with 100% lethality at all concentrations tested, followed by banana and hazelnut, respectively. Hazelnut and banana still killed the larvae at the lowest dose (7.81 ppm). The toxicity results observed in *A. salina* (Table 2) corroborate the results of cytotoxicity of these flavorings observed in *A. cepa*.

**Table 2.** Toxicity of cherry, banana and hazelnut flavorings to *Artemia salina* after 24 hours of exposed.

Flavoring ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Mortality								$LC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	1000	500	250	125	62.5	31.5	15.62	7.81	
Cherry	100	100	100	100	100	100	100	100	< 7.81
Banana	100	100	100	100	100	100	90	73	< 7.81
Hazelnut	100	100	100	70	46.66	3.33	0	0	66.09

$LC_{50}$  (Lethal Concentration 50%);  $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  high toxicity.

It was neither found in the literature and nor on the labels of flavorings, the specific chemical composition of cherry, banana and hazelnut additives. However, the literature contains studies demonstrating the toxicity, at the cellular level, of chemical constituents with diluent and preservative actions (Brasil 2007), according on the basic formulation of flavorings, and corroborating the data obtained for the three flavorings evaluated in this study.

Among these compounds, stands out the benzoic acid, responsible for maintaining uniformity and facilitating incorporation and dispersion of the flavor in food products. Analyzing the action at the cellular level of this diluent, Demir *et al.* (2015) found that the alcohol promoted significant damage to the mitotic spindle and therefore to cell division in human peripheral blood cells. Another diluent found in the flavoring formulation is diacetyl (2, 3-butadione). Whittaker *et al.* (2008) reported that this com-

pound in gene mutation assay in rat lymphoma caused significant damage to the loci of chromosome 11 of these cells, causing loss of expression of genes for thymidine kinase enzyme. Still, More *et al.* (2012) verified that the diacetyl diluent had the potential to replace thymine with guanine in regions of euchromatin and to cause disruption of hydrogen and disulfide bonds in the tertiary structure of enzymes involved in the process of cell division.

In the composition of food flavorings, preservative compounds are also found: boric acid, citric acid, potassium citrate and sodium citrate (Brasil 2007), which, according to Türkoğlu (2007), resulted in a significant reduction in the cell division index of root meristem cells *A. cepa*, proving to be cytotoxic. In turn, among the chemical constituents responsible for delaying the action of microorganisms, enzymes, and physical agents in flavoring solutions, potassium benzoate, sodium benzoate and potassium nitrate



(Brasil 2007) are preservatives that, according to Mpountoukas *et al.* (2010) and Zeguín *et al.* (2013), were cytotoxic and genotoxic to normal human peripheral blood cells.

The results obtained in this study and those already available in the scientific literature on the cellular toxicity of some constituents of the chemical composition of flavorings show that –although the use of flavoring additives is allowed by FAO, FEMA and ANVISA –there is an urgent need for clarification, through more detailed studies in the medium and long term, in different test systems, doses and exposure time, as to the toxicity of these substances. It results also indicate the need to set, as by high performance liquid chromatography, the chemical composition of flavorings in general, so as to consistently determine the toxicity of these additives property and ensure the safety of consumers.

## References

- Adami F.S., Conde S.R. Food and nutrition in life cycles. Lageado: Univates, 2016. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes / Aroma [on line]. Resolução N. 104 de 14 de maio de 1999. [Accessed on: June 13<sup>th</sup>, 2018]. Available at: [http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual\\_aditivos\\_aromatizantes.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual_aditivos_aromatizantes.htm).
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada RDC n.º. 05, de 15 de Janeiro de 2007 [on line]. [Accessed on: June 3<sup>rd</sup>, 2018]. Available at: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02\\_170107rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf).
- Carvalho B.D.L., Sales I.M.S., Peron A.P. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of UHT whole milk. Food Sci Technol. 2017;37:275-279.
- Demir E., Kocaoglu S., Kaya, R. Assessment genotoxic effects of benzyl derivatives by comet assay. Food Chem Toxicol. 2015;48:1239-1242.
- Gomes K.M.S., Oliveira M.V.G.A.D., Carvalho F.R.S., Menezes C.C., Peron A.P. Cytotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristem cells. Food Sci Technol. 2013;33:218-223.
- Guerra M., Souza M.J. How to observe the chromosomes: a guide to techniques in plant, animal and human cytogenetics. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.
- Herrero O., Martín J.P., Freire O.F., López L.C., Peropadre A., Hazen M.J. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. Mut Res. 2012;743:24-34.
- Koca N., Erbay Z., Kaymark-Ertekin, F. Effects of spray-dripping conditions on the chemical, physical and sensory properties of cheese powder. J Dairy Sci. 2015;98:2934-2943.
- Marques G.S., Silva S.I.O., Ferreira P.M.P., Peron A.P. Cytotoxic and genotoxic potential of liquid synthetic food flavorings evaluated alone and in combination. Food Sci Technol. (Campinas) 2015;35:183-188.
- Meyer B.N., Ferrign R.N., Putnam J.E., Jacobson L.B., Nicholas D.E., Mclaughlin J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982;45:31-34.
- More S.S., Raza, A., Vince, R. The butter flavorant, diacetyl, forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA, and leads to cell death. J Agricul Food Chem. 2012;12:3311-3317.
- Moura A.G., Santana, G.M., Ferreira P.M.P., Sousa J.M.C., Peron A.P. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allium cepa* L root meristems. Braz J Biol. 2016;76:439-443.
- Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Karell D., Poliliou S., Lialiaris T. (2010): Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. Food Chem-Toxicol. 2010;48:2934-2944.
- Neves E.S., Ferreira P.M.P., Lima L.H., Peron A.P. Action of aqueous extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on meristematic root cells of *Allium cepa* L. Anais Acad Bras Ciênc. 2014;86:1131-1137.
- Paredes P.F.M., Vasconcelos F.R., Paim R.T.T., Marques M.M.M., Morais, S.M., Lira S.M.,

Guedes M.I.F. Screening of bioactivities and toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. Evid Based Complement Alternat Med. (Print) 2016;2016.

Rosa C.S., Veras K.S., Silva P.R., Lopes-Neto J.J., Cardoso H.L.M., Alves L.P.L., Brito M.C.A., Amaral F.M.M., Maia J.G.S., Monteiro O.S., Moraes, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. Rev Bras de Plantas Med. 2016;18:19-26.

Sales I.M.S., Sousa J.B., Sousa F.K.S., Silva F.C.C., Ferreira P.M.P., Sousa J.M.C., Peron, A.P. Acute toxicity of grape, plum and orange synthetic food flavourings evaluated *in vivo* test systems. Food Techn Biotechn. 2017;55:51-55.

Tabrez S., Shakil S., Urooj M., Damanhourri G.A., Abuzenadah A.M., Ahmad, M. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface waters: an overview of the techniques and their efficacies. J Environ Sci Health, Part C.2011;9:250-275.

Türkoğlu Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mut Res. 2007;626:04-14.

Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis K., Lorida R. S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particular matter fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanism. Inter J Environ Res Pub Health. 2013;10:3886-3907.

Whittaker P., Clarke J.J., San R.H., Begley T.H., Dunkel V.C. Evaluation of the butter flavoring chemical diacetyl and a fluorochemical paper additive for mutagenicity and toxicity using the mammalian cell gene mutation assay in L5178Y mouse lymphoma cells. Food and Chem Toxicol. 2008;46:2928-2933.

Xu Z., Gu C., Wang K., Ju J., Wang H., Ruan K., Feng Y. Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of *Fructus arctii*. Phytomedicine. 2013;22:128-137. Doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.006

Zilifdar F., Alper-Hayta S., Yilmaz S., Kaplan-Özen Ç., Foto E., Aydoğan Z., Yildiz I., AkiE., Yalçın I., Diril N. Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives. Med Chem Res. 2014;23:480-486.

## Avaliação da atividade da enzima glutationa-s-transferase da minhoca *Eisenia foetida* exposta à ivermectina

### Evaluation of glutathione-s-transferase enzyme activity of the earthworm *Eisenia foetida* exposed to ivermectin

Moreira Tuerlinckx, Sandro<sup>1\*</sup>; Hahn Delfim, Daniel<sup>2</sup>; Kalil Huber, Ana Cláudia<sup>3</sup>; Araújo Gamboa Morselli, Tânia Beatriz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade da Região da Campanha, Tupy Silveira nº2099, Bagé/RS/Brasil. <sup>2</sup>Universidade da Região da Campanha. <sup>3</sup>Centro de Ciências Exatas e Ambientais, Universidade da Região da Campanha, Bagé- RS. <sup>4</sup>Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, FAEM/UFPel, Pelotas/RS/Brasil.

\*sandromtuer@gmail.com

Recibido: 10 de septiembre de 2018

Aceptado: 19 de septiembre de 2018

**Resumo.** Muitos tipos de drogas são usados na medicina veterinária para controlar e melhorar a saúde animal através de tratamentos terapêuticos e profiláticos. A desvantagem desta prática é que os produtos farmacêuticos e seus metabólitos são liberados no ambiente e podem influenciar a fauna do solo através da excreção do esterco ou pela posterior aplicação ao campo agrícola. As avermectinas são vastamente utilizadas na medicina veterinária e na agricultura. Estudos anteriores demonstraram que a ivermectina (IVM), um parasiticida amplamente utilizado, é muito tóxico para diversas espécies de invertebrados não-alvo. Tendo em vista que a IVM é pouco metabolizada, excretada de forma relativamente inalterada e pela escassez de dados sobre a toxicidade aos invertebrados do solo, foram investigados, neste estudo, os efeitos agudos e crônicos deste parasiticida sobre a glutathione-s-transferase (GST) da oligoqueta *Eisenia foetida*. As minhocas *Eisenia foetida* foram expostas à concentrações de IVM a 0, 1, 5, 10, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, e as amostras foram tomadas nos dias 7, 14 e 28 para determinação da atividade da GST. Os resultados mostraram que a duração da exposição alterou significativamente os efeitos do parasiticida investigado sobre a atividade de GST. Especificamente, após uma redução inicial, o prolongamento da exposição causou a indução da atividade da GST. Com o aumento da concentração de IVM, as atividades da GST foram inibidas significativamente após 7 dias de exposição. Em particular, o efeito inibitório foi significativo nas concentrações mais elevadas de tratamento (10, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>). Por outro lado, aos 14 e 28 dias foram observadas induções na atividade da enzima. A atividade da GST pode ser considerada como parâmetro sensível para avaliar a toxicidade da ivermectina para minhocas.

**Palavras-chave:** Avermectinas; Marcador bioquímico; Toxicidade; Minhocas.

**Abstract.** Many types of drugs are used in veterinary medicine to control and improve animal health through therapeutic and prophylactic treatments. The disadvantage of this practice is that pharmaceuticals and their metabolites are released into the environment and may influence soil fauna through manure excretion and subsequent application to agricultural field. The avermectins are extensively and increasingly used in veterinary medicine and agriculture. Previous studies have shown that ivermectin (IVM), a widely used parasiticide, is very toxic to many non-target invertebrate species. In view of the little metabolism and most of the ivermectin dose given to the animal is excreted, relatively unaltered, primarily in the feces and the scarcity of data on toxicity to soil invertebrates, acute and chronic effects of the parasiticide on the glutathione-s-transferase (GST) of the oligochaete *Eisenia foetida* were investigated. Earthworms of *Eisenia foetida* were exposed to IVM at 0, 1, 5, 10, 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup> concentrations; samples were taken at days 7, 14, and 28 exposure for determination of GST activities. The results showed that duration of the exposure significantly changed the effects of the investigated parasiticide on the GST activity. Namely, after the initial decrease, the prolongation of exposure caused the induction of the GST activity. With increasing IVM concentration, GST activities were inhibited significantly after 7 days of the exposure. In particular, the inhibition effect was significant at the higher treatment levels (10, 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>). On the other hand, at 14 and 28 days were observed inductions of enzyme activity. GST activity can be regarded as sensitive parameter for evaluating the toxicity of ivermectin to earthworms.

**Keywords:** Avermectins; Biochemical marker; Toxicity; Earthworms.

### Introdução

Substâncias farmacologicamente ativas são amplamente utilizadas na medicina humana e veterinária, para o diagnóstico, tratamento e

prevenção de várias doenças (Díaz-Cruz *et al.* 2003; Sarmah *et al.* 2006), entretanto, atualmente, são considerados importantes poluen-

tes orgânicos emergentes, tanto em ambientes terrestres como aquáticos (Carlsson *et al.* 2006; Morley, 2009; Lin *et al.* 2010; Horvat *et al.* 2012; Iglesias *et al.* 2012; Nie *et al.* 2013).

Embora estes fármacos sejam produzidos para alvos específicos, quando introduzidos no meio ambiente, eles podem agir sobre organismos não-alvo (Fent *et al.* 2006; Rombke *et al.* 2007), principalmente, devido ao fato destas substâncias e seus metabólitos manterem atividade e persistirem no ambiente (Zhou *et al.* 2007; Kwon-Rae *et al.* 2011).

De acordo com a orientação atual sobre a avaliação de risco ambiental na União Europeia, os medicamentos veterinários são uma ameaça para os organismos do solo e devem ser avaliados através de dados experimentais sobre o seus destinos e potenciais efeitos adversos (Römbke *et al.* 2010; Torre *et al.* 2012).

Medicamentos veterinários e seus metabólitos são eliminados principalmente pelas fezes ou urina dos animais tratados e podem ser potencialmente perigosos para espécies não-alvo como a fauna que habita tanto o solo como os esterco de origem animal (Sommer y Bibby 2002). Neste sentido, os efeitos de antiparasitários de uso veterinário frente a organismos que habitam esterco estão bem documentados (Sommer *et al.* 1992; Holter *et al.* 1993; Jensen *et al.* 2003).

A ivermectina (IVM) é um princípio ativo pertencente à classe das avermectinas, que são substâncias semi-sintéticas derivadas do microorganismo de solo *Streptomyces avermitilis*, possuindo atividade inseticida, acaricida e anti-helmíntica, fazendo parte do grupo químico chamado de macrolactonas ou lactonas macrocíclicas (Shoop *et al.* 1995).

A eficácia das avermectinas está relacionada ao seu mecanismo de ação, interagindo com os canais cloreto dependentes de glutamato em invertebrados. O parasiticida impede o fechamento desses canais, aumentando a permeabilidade aos íons Cl<sup>-</sup>, que gera hiperpolarização e transmissão neuronal reduzida, resultando em paralisia e morte dos parasitas. Além disso, também inibem os canais de cloreto ligados ao ácido g-aminobutírico (GABA), que ocorrem no sistema nervoso periférico de invertebrados e no sistema nervoso central dos vertebrados (Forrester *et al.* 2003; Omura 2008).

Devido ao seu largo espectro de atividade, alta eficiência e elevada margem de segurança, a ivermectina é um fármaco amplamente utiliza-

do (Shoop *et al.* 1995; Omura 2008), no entanto, o uso indiscriminado deste produto pode originar consequências danosas ao meio ambiente (Herd 1995).

A característica da ivermectina de forte adsorção ao solo e a matéria orgânica (Halley *et al.* 1989; Krogh *et al.* 2008), produz um baixo potencial de dessorção (Krogh *et al.* 2008) e, conseqüentemente, um baixo potencial de lixiviação (Halley *et al.* 1989; Opiel *et al.* 2004), devido a isso, segundo Mougin *et al.* (2003) este fármaco se dissipa lentamente.

Essas propriedades físico-químicas fazem com que a ivermectina seja muito persistente em fezes bovinas, mesmo quando expostas às condições ambientais (Sommer y Steffansen 1993; Suarez *et al.* 2003; Fernandez *et al.* 2009), apresentando concentrações relativamente constantes durante um período de até 60 dias (Iglesias *et al.* 2006).

Desta forma, os resíduos medicamentosos dos endectocidas desta classe ou seus metabólitos em fezes de bovinos ocasionam efeitos adversos em alguns organismos que habitam o esterco e invertebrados não-alvo que vivem no solo (Lumaret y Errouissi 2002; Suarez 2002).

Tem-se demonstrado que os insetos detritívoros e os coleópteros coprófagos são os principais organismos afetados pela presença de resíduos de lactonas macrocíclicas nos esterco (Errouissi *et al.* 2001; Suarez 2002; Iglesias *et al.* 2006; Suarez *et al.* 2009, Iglesias *et al.* 2011), entretanto não há consenso na literatura científica em relação aos efeitos adversos e toxicidade das avermectinas sobre a atividade de minhocas (Madsen *et al.* 1990; Sommer *et al.* 1992; Wratten *et al.* 1993; Svendsen *et al.* 2003). Entre os organismos pertencentes à comunidade dos decompositores, as minhocas são um dos componentes mais importantes, contribuindo significativamente para a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e formação do solo (Lavelle *et al.* 2007). No entanto, são altamente afetadas pela contaminação do solo; seu modo de alimentação e elevada relação superfície/volume facilita a assimilação e a rápida distribuição de substâncias tóxicas para os seus tecidos (Nadeau *et al.* 2001). Dentro deste contexto, as minhocas têm sido utilizadas como um organismo modelo para a avaliação de risco dos ecossistemas terrestres (Ratte *et al.* 2003).

Desde 1984, minhocas da espécie *Eisenia foetida* são preconizadas por organizações de padronização de testes para uso em ensaios de

ecotoxicologia terrestre (OECD 1984; ISO 1998), porque elas podem ser facilmente cultivadas em laboratório e são sensíveis a uma vasta gama de produtos tóxicos (Lowe y Butt 2007).

O uso excessivo e indiscriminado de lactonas macrocíclicas resulta em resíduos de avermectinas e conseqüente poluição ambiental (Lumaret y Errouissi 2002; Suarez 2002; Floate et al. 2005).

Quantidades crescentes desses tipos de produtos químicos sintéticos no ambiente exigem o desenvolvimento de biomarcadores para avaliar e monitorar os seus efeitos, que tradicionalmente eram apenas identificados pelos parâmetros de mortalidade e os danos à reprodução e crescimento dos organismos. Biomarcadores bioquímicos são cada vez mais utilizados nas avaliações dos riscos ecológicos dos ecossistemas aquáticos e terrestres (Rizwan-ul-Haq et al. 2012).

Neste sentido, as enzimas de detoxificação são largamente utilizadas para detectar toxicidade em diferentes ambientes. Entre estas enzimas, a glutathione-S-transferase (GST) desempenha um papel fundamental na desintoxicação de uma ampla gama de compostos (Bainy et al. 2000; Frova 2006; Aly y Schroder 2008).

As glutathione-S-transferases (Mannervik y Danielson 1988) (GST, EC 2.5.1.18) são membros de uma superfamília de proteínas diméricas multifuncionais envolvidas na detoxificação celular de compostos citotóxicos e genotóxicos e na prevenção de danos oxidativos aos tecidos (Mannervik et al. 1992; Armstrong 1997). Seu mecanismo catalítico é promover a adição nucleofílica do peptídeo glutathione (GSH-Glu-Cis-Gli) a uma extensa variedade de eletrófilos hidrofóbicos endógenos e exógenos, formando produtos conjugados que são mais polares e mais facilmente excretados do que os seus correspondentes precursores (Lannutti et al. 2012). Estudos comparando a sequência de aminoácidos confirmam que as classes de GSTs existem numa gama surpreendentemente ampla de organismos (Sheehan et al. 2001). Em mamíferos, por exemplo, as GSTs são principalmente citosólicas, com estrutura proteica homodimérica e classificadas em oito classes distintas:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\sigma$ ,  $\kappa$ ,  $\xi$  and  $\omega$  (Sheehan et al. 2001; Lannutti et al. 2012). Enquanto que, em minhocas da espécie *Eisenia foetida*, Bogeraas et al. (1996) e Rizwan-ul-Haq et al. (2012) caracterizaram a enzima glutathione-S-transferase e identificaram como pertencente a classe Pi ( $\pi$ ). Pesquisas relacionadas à elucidação de pro-

cessos detoxificantes e respostas adaptativas de proteínas como a GST podem ser úteis para uma melhor compreensão da toxicidade em organismos expostos a substâncias químicas (Otitoju y Onwurah 2007). Dentro deste contexto, estudos demonstraram a aplicabilidade das enzimas GSTs como biomarcadores bioquímicos em minhocas contra diferentes classes de poluentes ambientais (Booth et al. 2000; Lukkari et al. 2004; Velki y Hackenberger 2013). Saint-Denis et al. (1998) demonstraram que essas oligoquetas são metabolicamente bem equipadas para responderem à presença de substâncias químicas, principalmente devido a existência de atividade substancial da GST. Neste sentido, Lacourse et al. (2009) sugeriram esta enzima como potencial candidata a biomarcador molecular em estudos de poluição ambiental.

Pesquisas recentes têm demonstrado alterações na atividade da GST em minhocas após exposição a solos contaminados por metais, herbicidas, inseticidas e outros diversos agentes químicos (Booth et al. 2000; Saint-Denis et al. 2001; Lukkari et al. 2004; Xiao et al. 2006; Aly y Schroder 2008; Maity et al. 2008; Xie et al. 2011; Rizwan-ul-Haq et al. 2012), mas pouco tem sido relatado em relação a esta enzima como biomarcador frente à lactonas macrocíclicas.

O objetivo do presente estudo foi examinar os efeitos agudos e crônicos da ivermectina (IVM), um importante membro da classe das lactonas macrocíclicas, sobre a enzima glutathione-S-transferase em minhocas da espécie *Eisenia foetida*.

## Materiais e métodos

### Substâncias químicas

Para os testes, a substância padrão de ivermectina (22,23 dihidroavermectina-B1, pureza, > 98%), glutathione reduzida (GSH) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foram adquiridos da indústria química Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes químicos foram de grau laboratorial padrão.

### Organismo teste

Minhocas do gênero *Eisenia* da espécie *foetida* (Lumbricidae, Annelida) foram obtidas a partir do Minhocário da UFPel – Pelotas/RS e posteriormente multiplicadas e mantidas no minhocário da URCAMP/Bagé-RS de acordo com as condições descritas por (Morselli 2009). Posteriormente, foram selecionadas 50 minhocas adultas e com clitelo desenvolvido para dar iní-

cio a uma colônia mantida em esterco bovino e sob condições padronizadas de temperatura ( $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), fotoperíodo (12:12 h: ciclo claro-escuro) e umidade (75%) em câmara climatizada. As minhocas utilizadas nos experimentos foram adultas com clitelo desenvolvido e obtidas a partir da colônia padronizada, com pelo menos três meses de idade, mas não mais que um ano, com pesos individuais variando entre 350 e 550 mg. Então, estas foram retiradas do substrato de manutenção 24 h antes do início dos testes, selecionadas e armazenadas em placas de Petri sobre papel filtro úmido no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia Animal – CCR/URCAMP-Bagé, RS, sob temperatura de  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  com luz 12:12 h: ciclo claro-escuro, para esvaziamento do conteúdo intestinal.

#### Procedimento experimental

Foi utilizado esterco bovino como substrato teste neste estudo, oriundo dos mesmos animais e do mesmo local do esterco usado para a manutenção, livre de resíduos de produtos veterinários.

Para o experimento foram selecionadas concentrações de IVM ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ambientalmente relevantes com base em estudos anteriores Halley *et al.* (1989); Sommer y Steffansen (1993); Herd *et al.* (1996) e Iglesias *et al.* (2006) assim como, concentrações subletais ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) determinadas em trabalhos desenvolvidos por Halley *et al.* (1989); Gunn y Sadd (1994); Sun *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2012).

Desta forma, as minhocas foram divididas aleatoriamente em seis grupos, com quatro repetições: (1) controle:  $0 \text{ mg kg}^{-1}$ , (2) ivermectina (IVM):  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , (3),  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  (4),  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (5),  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  e (6)  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ .

A substância química teste (ivermectina [IVM]) foi dissolvida em acetona e em seguida, misturada ao esterco para alcançar as concentrações nominais nos tratamentos a serem efetuados com base na massa seca do substrato. Água destilada foi adicionada à mistura, para atingir 75% da massa. Os substratos depois de serem misturados com a substância química foram colocados em gabinete ventilado, para permitir a evaporação da acetona residual e posteriormente transferidos para recipientes plásticos. Água foi adicionada para compensar a massa perdida, devido à evaporação de acetona e, em seguida dez minhocas foram introduzidas em cada recipiente. Este teste segue as recomendações preconizadas

por Gao *et al.* (2007).

Para evitar que as minhocas escapem e que ocorra presença de organismos indesejados, os recipientes foram fechados com tampas perfuradas que permitem também uma adequada ventilação.

Os recipientes teste foram de poliestireno com uma base de 110 a 155 mm e com altura de 60 mm, mantidos sob temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  com luz 12:12 h: ciclo claro-escuro Laboratório de Bioquímica e Toxicologia Animal – CCR/URCAMP-Bagé, RS.

O teste de toxicidade para avaliar os efeitos sobre a enzima glutathiona-S-transferase de *Eisenia foetida* foi conduzido durante um período de 7, 14 e 28 dias de exposição de acordo com as recomendações de OECD (1984).

#### Avaliação da enzima GST em *Eisenia foetida*

##### Preparo das amostras

As minhocas foram retiradas dos recipientes ao término de cada período experimental, lavadas com água deionizada e antes das análises bioquímicas foram incubadas sem alimentação por vinte e quatro horas em papel de filtro Whatman nº 1 umedecido, à temperatura ambiente para esvaziar seu conteúdo do trato digestório (Reinecke y Reinecke 2007).

As oligoquetas inteiras, após o esvaziamento digestório foram congeladas em nitrogênio líquido e em seguida armazenadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise (não superior a uma semana) no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia Animal (CCR/URCAMP-Bagé/RS).

Os organismos teste foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) em quatro partes (4:1 peso:volume), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 0,1 mM) em um homogeneizador de tecidos *Heidolph* a 6.000 rpm. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 9.000g por 30 min em uma centrífuga Coleman modelo 90-1, resultando em um sobrenadante (S1) que foi utilizado para a medida da atividade enzimática da GST. Todos os preparos teciduais foram realizados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

##### Descrição do método enzimático

A atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST) foi medida usando o método preconizado por Habig *et al.* (1974) com CDNB como substrato para a medição espectrofotométrica em 340 nm à  $25^{\circ}\text{C}$ , utilizando o analisador bioquímico semiautomático *TP Analyzer* - Thermoplate. O ensaio foi realizado com a adição sucessiva de 960  $\mu\text{L}$  de tampão Tris (0,1 mol

L<sup>-1</sup>, pH 7), 10 µL de CDNB (100 mmol L<sup>-1</sup>), 10 µL de glutathiona (GSH, 100 mmol L<sup>-1</sup>) e 20 µL do sobrenadante de minhoca. A reação foi iniciada pela adição de GSH.

Uma unidade da GST foi calculada como µmol de CDNB conjugado por mg de proteína (U mg<sup>-1</sup> proteína), usando o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizado a variação da absorbância por minuto 1 (Δ ABS/minuto) durante 60 segundos conforme Habig *et al.* (1974), desta forma, a atividade enzimática foi expressa em mmol mg<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup>.

O conteúdo de proteínas totais para o extrato enzimático foi mensurado pelo método de Biuret por meio de um kit diagnóstico (Labtest – Lagoa Santa, MG/Brasil). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

#### Análise estatística

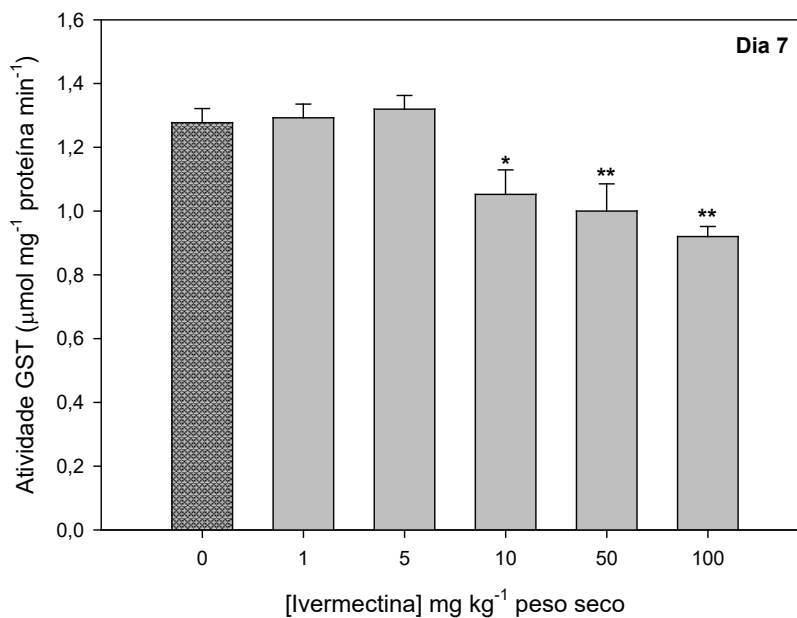
Todos os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias (Teste de Levene), como pressuposto para a realiza-

ção do teste de ANOVA de uma via entre os grupos testados, seguidos de comparações post-hoc (teste de Duncan em dois níveis de significância: P < 0,05 e P < 0,01) para indicar a diferença entre grupos tratados em relação ao grupo controle.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software IBM SPSS 20 e os dados plotados por intermédio do software SigmaPlot 10.0.

#### Resultados

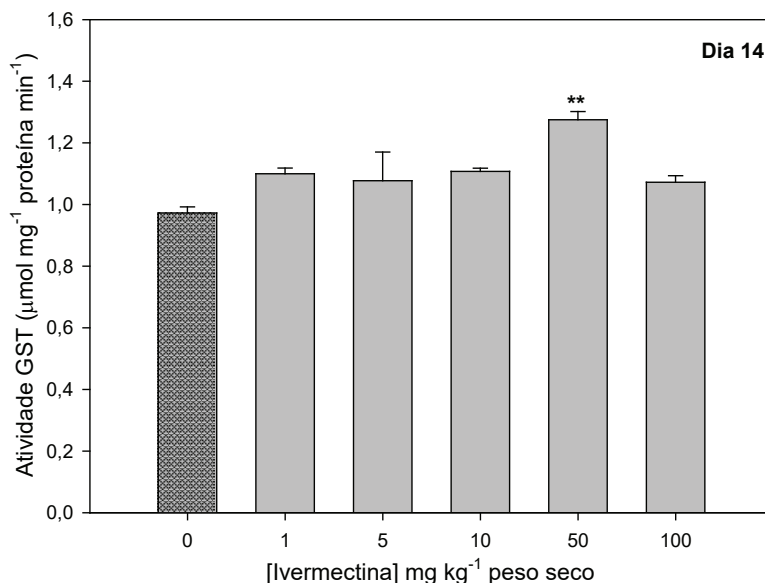
Conforme observado na *Figura 1*, aos sete dias de exposição à ivermectina detectou-se diferenças (ANOVA, F = 9.39) entre os grupos testados. Foi verificado um pequeno aumento na atividade da glutathiona-s-transferase (GST) nas concentrações de 1 e 5 mg kg<sup>-1</sup>, embora não seja estatisticamente diferente do controle. Na concentração de 10 mg kg<sup>-1</sup> pode-se observar que houve uma redução significativa (P < 0,05) na atividade da GST, enquanto nas concentrações de 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, foi verificado uma maior redução (P < 0,01) na atividade da GST em relação ao grupo controle.



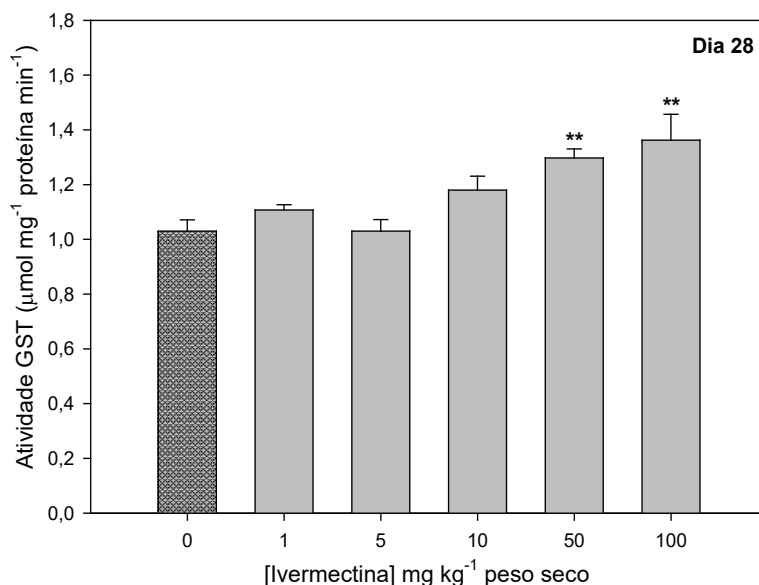
**Figura 1.** Atividade da enzima glutathiona-S-transferase de *Eisenia foetida* exposta a diferentes concentrações de ivermectina durante sete dias. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. \* Difere significativamente do controle (P < 0,05); \*\* Difere significativamente do controle (P < 0,01).

Aos catorze dias de exposição à ivermectina, diferenças (ANOVA,  $F = 4.80$ ) entre os grupos também foram detectadas, houve um aumento ( $P < 0,01$ ) na atividade da enzima glutiona-s-transferase na concentração de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto que nas demais concentrações não foram verificadas diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Figura 2). Foi observado que aos vinte e oito dias de ex-

posição à ivermectina diferenças (ANOVA,  $F = 7.05$ ) entre os grupos, devido a um aumento ( $P < 0,01$ ) da atividade da enzima glutiona-s-transferase, nas concentrações de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , em quanto que nas demais concentrações ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) estatisticamente não houveram diferenças em relação ao grupo controle, conforme observado na figura 3.



**Figura 2.** Atividade da enzima glutiona-S-transferase de *Eisenia foetida* exposta a diferentes concentrações de ivermectina durante catorze dias. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*\* Difere significativamente do controle ( $P < 0,01$ ).



**Figura 3.** Atividade da enzima glutiona-S-transferase de *Eisenia foetida* exposta a diferentes concentrações de ivermectina durante vinte e oito dias. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*\* Difere significativamente do controle ( $P < 0,01$ ).



## Discussão

Durante este estudo, foi verificado que aos sete dias de exposição à ivermectina houve uma redução significativa na atividade da GST de *Eisenia foetida* nas concentrações de 10 mg kg<sup>-1</sup> a 100 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que nas concentrações mais baixas não foi observado alteração em relação ao grupo controle. Esta inibição evidenciada na atividade da GST pode ser atribuída ao estresse tóxico ocasionado pela ivermectina sobre a *Eisenia foetida*.

De acordo com Halley *et al.* (1989) o nível de avermectinas excretado nas fezes varia conforme o tipo de animal, doses administradas e formas de aplicação, podendo alcançar concentrações de até 18.5 ± 7.4 mg kg<sup>-1</sup> (Herd *et al.* 1996).

Embora tenha sido demonstrado em alguns estudos que os efeitos da ivermectina em minhocas sejam improváveis em concentrações ambientalmente relevantes (Svendsen *et al.* 2003; Kaneda *et al.* 2006), os resultados obtidos neste trabalho mostram que a atividade da GST é inibida nestes organismos dentro das condições de ensaio utilizadas.

A diminuição da atividade desta enzima pode ser atribuída ao acúmulo de conjugados de GSH, possivelmente pela inibição seletiva da expressão gênica da GST como demonstrado por Srivastava *et al.* (1999). Somando-se a isso, o estresse oxidativo gerado pelo excesso de radicais livres ocasionado pela exposição a produtos químicos também pode ajudar a explicar este fato (Xie *et al.* 2001; Xue *et al.* 2009). Entre os sistemas endógenos de detoxificação, a GST possui um papel crítico na proteção contra eletrófilos e produtos do estresse oxidativo, por catalisar a conjugação da GSH com uma ampla variedade de compostos, desta forma a inibição da enzima resulta em menor proteção celular, menor metabolização de xenobióticos e aumento na suscetibilidade ao estresse oxidativo (Sheehan *et al.* 2001).

Têm-se demonstrado em outras pesquisas que a atividade da GST de *Eisenia foetida* também pode ser reduzida durante a exposição a altas concentrações de substâncias como o decabromodifenil éter (Xie *et al.* 2011) e tetrabromobisfenol A (Xue *et al.* 2009).

Por outro lado, Lin *et al.* (2010) mostraram que a atividade da GST de *E. foetida* foi estimulada após uma exposição de dois dias ao triclosan com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup>, no entanto, o efeito prolongado deste produto resultou em inibição da enzima.

Há escassez de dados na literatura em relação aos efeitos de lactonas macrocíclicas sobre a GST de *Eisenia foetida*, entretanto trabalhos conduzidos em outras espécies revelam que a exposição às concentrações crescentes (100 e 300 mg kg<sup>-1</sup> solo) de abamectina diminui a atividade da GST de *Porcellio scaber* (Kolar *et al.* 2010), enquanto que Jr. Vaz *et al.* (2004) não observaram alteração na GST de *Boophilus microplus* frente à ivermectina.

Neste estudo, foi observado que aos catorze dias de exposição à IVM houve flutuações na atividade da enzima glutationa-S-transferase, com elevação registrada de 1,27 ± 0,05 mmol mg<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup> na concentração de 50 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que nas demais concentrações não houveram diferenças em relação ao grupo controle (0,97 ± 0,039 mmol mg<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup>).

As exposições a fatores de estresse ambiental podem regular vários genes, estimulando ou inibindo a expressão gênica de proteínas relacionadas a funções de proteção celular (Rizwan-ul-Haq *et al.* 2012). Desta forma, o contato com a ivermectina durante 14 dias poderia desencadear o estímulo de genes responsáveis pela síntese da enzima GST, explicando o fato do aumento da atividade neste período.

Ao contrário da redução na atividade da GST observada aos sete dias de exposição à IVM, aos vinte oito dias de tratamento os resultados mostram claramente valores elevados na atividade enzimática em resposta às concentrações de 50 mg kg<sup>-1</sup> e 100 mg kg<sup>-1</sup> (1,29 ± 0,06 e 1,36 ± 0,19 mmol mg<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup>, respectivamente) em relação ao controle com atividade 1,03 ± 0,08 unidades de GST mg<sup>-1</sup> proteínas.

Dados semelhantes foram observados por Rizwan-ul-haq *et al.* (2012) que relataram indução da GST de *Eisenia foetida* expostas às elevadas concentrações de roxarsona e ácido arsenílico. Da mesma forma, em estudos *in vitro* conduzidos por El-Shenawy (2010) houve aumento na atividade da GST em hepatócitos de ratos expostos à abamectina. Também foi demonstrado que a substância decabromodifenil éter induz a atividade da GST, embora somente em baixas concentrações (Xie *et al.* 2011).

A indução da GST é um processo fundamental na proteção celular contra uma variedade de substâncias tóxicas pró-oxidantes (Otoju y Onwurah 2007). Além disso, promove uma melhor detoxificação dos xenobióticos através da formação de um complexo com a GSH (El-Shenawy 2010).

O aumento na atividade da GST aos 28 dias de exposição observado neste estudo, pode ser devido a uma resposta adaptativa da *Eisenia foetida* frente à ivermectina, como demonstrado por (El-Shenawy 2010), que relataram em hepatócitos de ratos a adaptação a vários inseticidas pela indução da GST.

Respostas adaptativas a substâncias químicas estão relacionadas com um incremento na expressão gênica da GST, como verificado por Nadeau *et al.* (2001) após a exposição de *Eisenia foetida* a metais e a compostos como a roxarsona e ao ácido arsenílico (Rizwan-ul-Haq *et al.* 2012).

### Conclusão

Neste trabalho, foi observado que a ivermectina em altas concentrações (10 mg kg<sup>-1</sup>, 50 mg kg<sup>-1</sup> e 100 mg kg<sup>-1</sup>) reduz a atividade da GST de *Eisenia foetida* aos sete dias de exposição, possivelmente ocasionado pelo estresse tóxico. Entretanto, com o prolongamento da exposição (14 e 28 dias) houve uma indução da atividade enzimática, provavelmente resultante de uma adaptação metabólica neste organismo. Este estudo foi útil para compreender o papel da GST como um biomarcador potencial de exposição a substâncias contaminantes do solo como a ivermectina em *Eisenia foetida*, no entanto pesquisas adicionais necessitam ser realizadas para avaliar o efeito deste fármaco por intermédio de outros testes laboratoriais e de campo.

Agradecimentos: Ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar (PPG-SPAF/UFPEL-Pelotas/RS) e à Pró-Reitoria de Inovação, Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão (PROIPPEX) da Universidade da Região da Campanha (URCAMP/Bagé-RS) pelo financiamento deste estudo.

### Bibliografia citada

Aly M., Schroder P. Effect of herbicides on glutathione S-transferases in the earthworm, *Eisenia fetida*. Environ Sci Pollut Res Int. 2008;15:143–149.

Armstrong R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chem Res Toxicol. 1997;10:2–18.

Bainy A.C.D., Almeida E.A., Muller I.C., Ventura E.C., Medeiros I.D. Biochemical responses in farmed mussels *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC Brazil. Mar Environ Res. 2000;50:411–416.

Booth L.H., Heppelthwaite V., McGlinchy A. The effect of environmental parameters on growth, cholinesterase activity and glutathione S-transferase activity in the earthworm *Apporectodea caliginosa*. Biomarkers. 2000;5:46–55.

Carlsson C., Johansson A.K., Alvan G., Bergman K., Kuhler T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci Total Environ. 2006;364:67–87.

Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. Trends Analyt Chem. 2003;22:340–351.

El-Shenawy N.S. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. Toxicol In Vitro. 2010;24:1148–1157.

Errouissi F., Alvinerie M., Galtier P., Kerboeuf D., Lumaret J.P. The negative effects of the residues of ivermectin in cattle dung using a sustained-release bolus on *Aphodius constants* (Duft.) (Coleoptera: Aphodiidae). Vet Res. 2001;32:421–427.

Fent K., Weston A.A., Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat Toxicol. 2006;76:122–159.

Fernandez C., San Andres M., Porcel M.A., Rodriguez C., Alonso A., Tarazona J.V. Pharmacokinetic profile of ivermectin in cattle dung excretion, and its associated environmental hazard. Soil Sediment Contam. 2009;18:564–575.

Floate K.D., Wardhaugh K.G., Boxall A.B., Sherratt T.N. Fecal residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in the pasture environment. Annu Rev Entomol. 2005;50:153–179.

Forrester S.G., Prichard R.K., Dent J.A., Beech R.N. *Haemonchus contortus*: HcGluCl $\alpha$  expressed in *Xenopus oocytes* forms a glutamate-gated ion channel that is activated by ibotenate and the antiparasitic drug ivermectin. Mol Biochem Parasitol. 2003;129:115–121.

Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. Biomed Eng. 2006;149–169.

Gao Y., Sun Z., Liu Y., Sun X., Li Y., Bao Y., Wang G., Wang G. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. Eur J Soil Biol. 2007;43:S246-S251.

Gunn A., Sadd J.W. The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*. Pedobiologia. 1994;38:327-333.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130-7139.

Halley B.A., Jacob T.A., Lu A.Y. The environmental impact of the use of ivermectine: Environmental effects and fate. Chemosphere. 1989;18:1543-1563.

Herd R. Endectocidal drugs: Ecological Risks and Counter-Measures. Int J Parasitol. 1995;(25)8:875-885.

Herd R., Sams R.A., Ashcraft S.M. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. Int J Parasitol. 1996;26:1087-1093.

Holter P., Sommer C., Gronvold J., Madsen M. Effects of ivermectin treatment on the attraction of dung beetles (Coleoptera, Scarabaeidae and Hydrophilidae) to cow pats. Bull Entomol Res. 1993;83:53-58.

Horvat A.J.M., Petrovic´ M., Babic´ S., Pavlovic´ D.M., Asperger D., Pelko S., Mance A.D., Kastelan-Macan M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. Trends Analyt Chem. 2012;31:61-84.

Iglesias A., Nebot C., Miranda J.M., Vázquez B.I., Cepeda A. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Environ Sci Pollut Res Int. 2012;19(8):3235-49.

Iglesias L.E., Fusé L.A., Lifschitz A.L., Rodríguez E.M., Sagüés M.F., Saumell C.A. Environmental monitoring of ivermectin excreted in spring climatic conditions by treated cattle on

dung fauna and degradation of faeces on pasture. Parasitol Res. 2011;108:1185-1191.

Iglesias L.E., Saumell C.A., Fernandez A.S., Fuse L.A., Lifschitz A.L., Rodriguez E.M., Stefan P.E., Fiel, C.A. Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. Parasitol Res. 2006;100:93-102.

International Standard Organization (ISO). Soil Quality: Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part II. Method for the Determination of Effects on Reproduction. ISO, Geneva. Standard Number No. 11268-2. 1998.

Jensen J., Krogh P.H., Sverdrup L.E. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia metaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). Chemosphere. 2003;50:437-443.

Jr Vaz I.S., Lermen T.T., Michelon A., Ferreira C.A.S., Freitas D.R.J., Termignoni C., Masuda A. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. Vet Parasitol. 2004;119:237-245.

Kaneda S., Yamashita N., Uchida T., Shimano S., Miyoshi N., Sasaki M., Enami Y. Effects of ivermectin in dung pats on earthworm (Megascopidae) populations and pat degradation in Japanese grassland. Appl Soil Ecol. 2006;31:280-285.

Kolar L., Jemec A., Van Gestel C.A.M., Valant J., Hrzenjak R., Kozuh Erzen N., Zidar P. Toxicity of abamectin to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Ecotoxicology. 2010;19:917-927.

Krogh K.A., Soeborg T., Brodin B., Halling-Sorensen B. Sorption and mobility of ivermectin in different soils. J Environ Qual. 2008;37:2202-2211.

Kwon-Rae K., Gary O., Soon-Ik K., Kyu-Ho S., Deog-bae L., Yong S.O. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. Water Air Soil Pollut. 2011;214:163-174.

Lacourse E.J., Hernandez-Viadel M., Jefferies

- J.R., Svendsen C., Spurgeon D.J., Barrett J., Morgan A.J., Kille P., Brophy P.M. Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular -based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Environ Pollut. 2009;157:2459-2469.
- Lannutti F., Marrone A., Nazzareno R.E. Binding of GSH conjugates to  $\pi$ -GST: A cross-docking approach. J Mol Graph Model. 2012;32:9-18.
- Lavelle P., Barot S., Blouin M., Decaëns T., Jimenez J.J., Jouquet P. Earthworms as key actors in Self-organized soil systems. Cap. 5. In: Ecosystem Engineers, Elsevier, Inc. 2007. P. 77-106.
- Lin D.S., Zhou Q., Xu Y., Chen C., Liu Y. Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. Environ Pollut. 2012;171:46-51.
- Lin D.S., Zhou Q.X., Xie X.J., Liu Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). Chemosphere. 2010;81:1328-1333.
- Lowe C.N., Butt N.R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. Eur J Soil Biol. 2007;43:281-288.
- Lukkari T., Taavitsainen M., Soimasuo M., Oikari A., Haimi J. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure, differences between populations with and without earlier metal exposure. Environ Pollut. 2004;129:377-386.
- Lumaret J.P., Errouissi F. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non-target fauna of pastures. Vet Res. 2002;33:547-562.
- Maity S., Roy S., Chaudhury S., Bhattacharya S. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. Environ Pollut. 2008;151:1-7.
- Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Ilio C., Ketterer B., Listowsky L., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W.R., Pickett C.B., Sato K., Widersten M., Wolf C.R. Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem J. 1992;282:305-306.
- Mannervik B., Danielson U.H. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. CRC Crit Rev Biochem. 1988;23:283-337.
- Morley N. Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. Environ Toxicol Pharmacol. 2009;27:161-175.
- Morselli, T.B.G.A. Minhocultura. Pelotas RS: UFPEL. 2009.
- Mougin C., Kollmann A., Dubroca J., Ducrot P.H., Alvinerie M., Galtier P. Fate of the veterinary medicine ivermectin in soil. Environ Chem Lett. 2003;1:131-134.
- Nadeau D., Corneau S., Plante I., Morrow G., Tanguay R.M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. Cell Stress Chaperones. 2001;6:153-163.
- Nie X.P., Liu B.Y., Yu H.J., Liu W.Q., Yang Y.F. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. Environ Pollut. 2013;172:23-32.
- Omura S. Ivermectin: 25 years and still going strong. Int J Antimicrob Agents. 2008;31:91-98.
- Oppel J., Broll G., Löffler D., Meller M., Rombke J., Ternes T., Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. Sci Total Environ. 2004;328:265-272.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for Testing of Chemicals, Earthworm, Acute Toxicity Tests (Filter Paper Test and Artificial Soil Test), vol. 207. Paris. 1984.
- Otitoju O., Onwurah I.N.E. Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment. Afr J Biotechnol. 2007;6:455-1459.
- Ratte H.T., Hammers-Wirtz M., Cleuvers M. Ecotoxicity testing. Cap. 7. In: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. Eds. Bioindi-

cators and biomonitors. Elsevier Science Ltd; 2003. P. 221–256.

Reinecke S.A., Reinecke A.J. Biomarker response and biomass change of earth-worms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007;66:92–101.

Rizwan-UI-Haq M., Zhenling Z., Yongxue S., Wenguang X. Evaluation of glutathione s-transferase as toxicity indicator for roxarsone and arsanilic acid in *Eisenia fetida*. *J Appl Toxicol.* 2012;32:731–738.

Römbke J., Hempel H., Scheffczyk A., Schallnaß H.J., Alvinerie M., Lumaret J.P. Environmental risk assessment of veterinary pharmaceuticals: Development of a standard laboratory test with the dung beetle *Aphodius constans*. *Chemosphere.* 2007;70:57–64.

Römbke J., Krogh K.A., Moser T., Scheffczyk A., Liebig M. Effects of the veterinary pharmaceutical ivermectin on soil invertebrates in laboratory tests. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010;58:332–340.

Saint-Denis M., Labrot F., Narbonne J.F., Ribera D. Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the earthworms *Eisenia fetida andrei*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1998;35:602–614.

Saint-Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Ribera D. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of lead acetate. *Soil Biol Biochem.* 2001;33:395–404.

Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* 2006;65:725–759.

Sheehan D., Meade G., Foley V.W., Dowd C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001;360:1–16.

Shoop W.L., Mrozek H., Fisher M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet Parasitol.* 1995;59:139–156.

Sommer C., Bibby B.M. The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil. *Eur J Soil Biol.* 2002;38:155–159.

Sommer C., Steffansen B. Changes with time after treatment in the concentrations of ivermectin in fresh cow dung and in cow pats aged in the field. *Vet Parasitol.* 1993;48:67–73.

Sommer C., Steffansen B., Nielsen B.O., Jensen V., Jespersen K.M.V., Springborg J.B., Nansen P. Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pouron treatment—concentrations and impact on dung fauna. *Bull Entomol Res.* 1992;82:257–264.

Srivastava S.K., Singhal S.S., Hu X., Awasthi Y.C., Zimniak P., Singh SV. Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Arch Biochem Biophys.* 1999;366:89–94.

Suárez V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Vet Res.* 2002;33:563–573.

Suárez V.H., Lifschitz A.L., Sallovitz J.M., Lanusse C.E. Effects of faecal residues of moxidectin and doramectin on the activity of arthropods in cattle dung. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009;72:1551–1558.

Suárez V.H., Lifschitz A.L., Sallovitz J.M., Lanusse C.E. Effects of ivermectin and doramectin faecal residues on the invertebrate colonization of cattle dung. *J Appl Entomol.* 2003;127:481–488.

Sun Y., Diao X., Zhang Q., Shen J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere.* 2005;60:699–704.

Svendson T.S., Grønvold J., Holter P., Sommer C. Field effects of ivermectin and fenbendazole on earthworm populations and the disappearance of dung pats from bolus-treated cattle. *Appl Soil Ecol.* 2003;24:207–218.

Torre A.D.L., Iglesias I., Carballo M., Ramirez P., Munoz M.J. An approach for mapping the vulnerability of European Union soils to antibiotic contamination. *Sci Total Environ.* 2012;414:672–679.

Velki M., Hackenberger B.K. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere*. 2013;90:1216–1226.

Wang Y., Cang T., Zhao X., Yu R., Chen L., Wu C., Wang Q. Comparative acute toxicity of twenty-

four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;79:122–128.

Wratten S.D., Mead-Briggs M., Gettinby G., Ericsson G., Baggott D.G. An evaluation of the potential effects of ivermectin on the decomposition of cattle dung pats. *Vet Rec*.

## REPORTE DE CASOS

---

### **Acute carbon monoxide poisoning with coexisting cerebral and myocardial infarction: The brain-heart connection and challenges of management in resource-limited settings** **Intoxicación aguda por monóxido de carbono con infarto cerebral y de miocardio coexistente: la conexión cerebro-corazón y los desafíos del manejo en entornos con recursos limitados**

Oghuvwu, Sunday Omokiniovo\*; Isah, Ambrose Ohumagho; Opadeyi, Abimbola; Ayinbuomwan, Stephen A.

Department of Internal Medicine, University of Benin Teaching Hospital, Benin-City, Nigeria.

\*sunnydoc2003@yahoo.co.uk

Recibido: 23 de febrero 2017

Aceptado: 20 de septiembre de 2018

**Abstract.** Carbon monoxide poisoning pose significant public health consequence and management can be challenging in resource-poor countries. This is a commentary of a 40 year-old farmer with a five day history of loss of consciousness following overnight inhalation of carbon monoxide. Neuroimaging and electrophysiologic studies showed bilateral internal capsule and myocardial infarction. He had unsuccessful treatment with normobaric oxygen therapy in the absence of hyperbaric oxygen. This case depicts the brain-heart connection in carbon monoxide poisoning and highlights the challenges of management in a resource poor setting.

**Keywords:** Carbon monoxide; Poisoning; Acute; Infarction.

**Resumen.** La intoxicación por monóxido de carbono representa un significativo problema para la salud pública de cualquier país y su manejo puede resultar en un gran desafío en los países emergentes, con escasez de recursos para la atención de este tipo de pacientes. Se presenta el caso de un agricultor de 40 años de edad, con antecedentes de cinco días previos de pérdida de la conciencia, posterior a la inhalación de monóxido de carbono. Las evaluaciones realizadas: tomografía axial computada de cerebro y electrocardiograma, mostraron la presencia concomitante de infarto cerebral, con compromiso de ambas cápsulas internas e Infarto de miocardio, respectivamente. Se inició tratamiento con oxígeno normobárico, falleciendo el paciente dentro de las 24 horas posteriores a su admisión. Este caso representa la conexión en la afectación de corazón y cerebro, en intoxicaciones por monóxido de carbono y sirve para destacar los desafíos de su manejo en entornos con limitaciones de recursos.

**Palabras clave:** Monóxido de carbono; Envenenamiento; Accidente cerebrovascular; Infarto de miocardio

### **Introduction**

Carbon monoxide (CO) poisoning is commonly under diagnosed, under treated and results in preventable morbidity and mortality in resource-limited settings. (Raub *et al.* 2000). The precise number of individuals who have suffered from CO intoxication is not known. The health effects associated with exposure to CO range from the more subtle cardiovascular and neurobehavioral effects at low concentrations to unconsciousness and death after acute or chronic exposure to higher concentrations of CO. The morbidity and mortality resulting from the latter exposures are described briefly to complete the picture of CO exposure in present-day society. The symptoms, signs and prognosis of acute CO poisoning correlate poorly with the level of carboxyhemoglobin (COHb) (Afolayan *et al.* 2014).

There are copious commentaries of isolated

neurologic and cardiovascular complications of CO (Ernst and Zibrak 1998; Prockop 2007). Reports of coexisting cerebral and myocardial infarction are rare and have not been reported in our environment. We report a case of carbon monoxide poisoning with coexisting cerebral and myocardial infarction in a young healthy adult male without risk factors to illustrate the fatality and challenges of management in resource-poor settings.

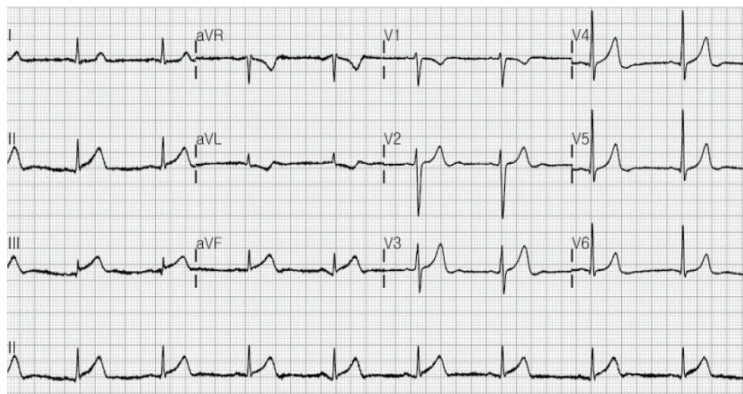
### **Case description**

A 40 year old farmer with a five-day history of loss of consciousness following overnight inhalation of exhaust vapour from an indoor power generator. He was last seen conscious twelve hours earlier. He was found unconscious with two other persons who became awake on exposure to standard oxygen therapy. He had two

episodes of non-projectile vomiting. There was no history of head injury, epilepsy, hypertension or diabetes mellitus. He had pyrexia of 39 degree Celsius, and was markedly dehydrated. Glasgow coma score was 4/15 – eye opening=2, verbal response=1, motor response=1. The pupils were equal, 3mm in diameter, and sluggish to light. There was global hypotonia and hyporeflexia with bilateral extensor plantar response. Cardiovascular examination is significant only for tachycardia (144 bpm), and blood pressure of 150/80 mmHg. The respiratory rate was 56 cpm with widespread crepitations.

An initial consideration of acute CO poisoning with cerebral and non-cardiogenic pulmonary oedema was entertained and subsequently commenced on normobaric oxygen, intravenous 20% mannitol, 0.9% saline, frusemide and broad-spectrum antibiotics.

Complete blood count showed haematocrit of 53.2% (haemoglobin=17.0 g/dl), neutrophilic leukocytosis of  $12.5 \times 10^3$  cells/ $\mu$ l (granulocytes 92.3%, lymphocytes 4.6%, monocytes 3.1%), elevated mean corpuscular volume (MCV) 104 fl/red cell, and thrombocytopenia of  $71 \times 10^3$  cells/ $\mu$ l. Other red cell indices were normal. Blood chemistry revealed hypernatraemia (149 mmol/l), hypokalaemia (2.5 mmol/l) and acidosis (bicarbonate=15 mmol/l). Random blood glucose was 116 mg/dl and urinalysis showed urobilinogenuria. Brain computer tomography scan done six hours into admission revealed bilateral internal capsule haemorrhagic infarct (figure 1). Electrocardiography demonstrated



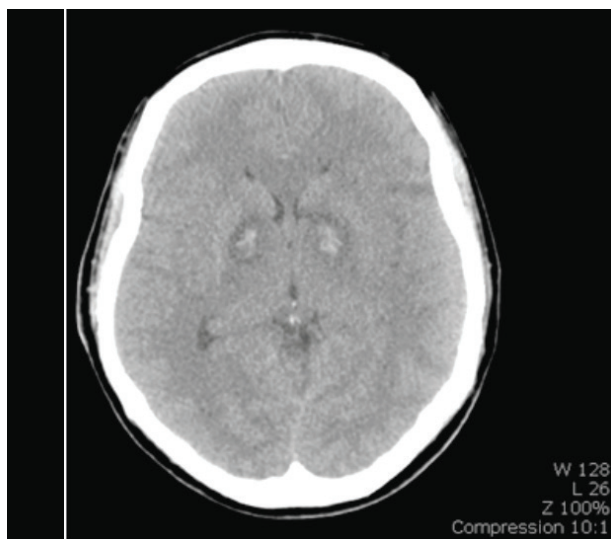
**Figure 2.** Electrocardiogram showing ST elevation in leads II, III, and aVF.

sinus tachycardia, left axis deviation and ST segment elevation in inferior leads (figure 2). The diagnosis was then modified to CO poisoning with coexisting cerebral and myocardial infarction. In spite of the subsequent introduction of aspirin, patient condition deteriorated rapidly and finally succumbed to illness on the second day of admission.

### Discussion

The diagnosis of CO poisoning was based on historical and epidemiological factors in this case. Existing data suggest that unintentional poisoning from electrical generators is common in developing countries (Raub *et al.* 2000, Weaver 2009). Sequelae may be immediate or delayed occurring 2–21 days after exposure (Ernst and Zibrak 1998). The patient developed complications attributable to CO poisoning within five days of exposure. For example, vomiting and systolic hypertension may be explained by the cerebral oedema (Cushing's reflex), while the tachypnoea is possibly a compensatory response to acidosis from carbon dioxide retention. Tachycardia, pyrexia and pulmonary oedema could relate to the myocardial ischaemia and direct toxicity of CO. Haemoconcentration due to dehydration, may explain the observed hypernatremia and relative polycythemia. The hypokalaemia could not be readily explained but diuretic-induced loss could not be ruled out. Leukocytosis and fever without a septic focus excluded the consideration of sepsis. The low platelets may result from direct anti-platelet effect of CO.

Cerebral infarction is a rare and delayed presentation of CO poisoning and can occur in



**Figure 1.** Computer tomography scan showing bilateral internal capsule haemorrhagic infarct.



subjects with or without risk factors (Finelli and Di Mario 2004). Conversely, the cardiovascular consequences of CO poisoning are frequent and limited to isolated case reports of electrocardiographic changes, myocardial dysfunction, and infarction (Chang *et al.* 1999). Evidence of the brain-heart connection is restricted to coexisting cerebral oedema and myocardial infarction (Choi 2001, Satran *et al.* 2005). This case is of interest because it describes the coexistence of bilateral internal capsule infarction and ST segment elevation myocardial infarction in the same patient. Available reports suggest that in CO poisoning, the basal ganglia, particularly the globus pallidus is the preferential site of infarction, and non ST elevation myocardial infarction is the commonest myocardial injury (Satran *et al.* 2005, Prockop 2007).

Injury in CO poisoning is mediated via a combination of direct CO toxicity, carboxyl haemoglobin-induced hypoxia, and inflammation (Goldbaum *et al.* 1976). CO binds 200 to 250 times more avidly to haemoglobin than oxygen, and decrease oxygen saturation in a dose-dependent fashion seen as a leftward shift in the oxygen dissociation curve. In addition, 10% - 15% of CO binds to myoglobin, cytochromes C and P450 leading to myocardial depression and impaired cellular respiration and hypoxia. CO directly induces mitochondrial dysfunction, endothelial homeostatic disturbance and tissue oedema. Hypoxia initiate a vicious cycle of free oxygen and nitric oxide radical formation sustained by lipid peroxidation and neutrophil activation which in turn leads to cellular apoptosis and necrosis. CO interaction with platelet heme protein, nitric oxide and myeloperoxidase leads to infarction and oxidative endothelial injury.

Successful management of CO poisoning requires measurement of carboxyl haemoglobin (COHb) levels and institution of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) (Juurlink *et al.* 2000). The treatment of CO poisoning is anchored on the rapid restoration of oxygenation to bodily tissues. HBOT shortens the half-life of CO from 4-5 hours to 20 minutes, rapidly reverses CO's binding to haemoglobin and myoglobin, and directly provide oxygen to tissues independent of haemoglobin. COHb levels > 25% and presence of neurologic and/or cardiovascular symptoms are independent indications for HBOT (Ernst and Zibrak 1998, Weaver 2009). Clearly, our patient did not have the benefit of this treatment, which may have influenced the

outcome. Other limitations of this report are the absence of cardiac enzyme assay, arterial blood gas analysis and cerebral/coronary angiography, which featured copiously in reports from other climes. Management of carbon monoxide poisoning is therefore challenging in resource-limited settings.

### Conclusion

Coexisting cerebral and myocardial infarction in CO poisoning is rare but real and probably depends on the dose and duration of exposure. This case depicts the brain-heart connection in CO poisoning and highlights the challenges of management in resource-poor settings.

### References

- Afolayan J.M., Edomwonyi N.P., Esangbedo S.E. Carbon monoxide poisoning in a Nigerian home: case reports. *The Nigerian Postgraduate Medical Journal*. 2014;21(2):199-202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25167600>
- Chang J.B., Jeong H.W., Kim K.N., Kim D.W., Kim C.S. Acute carbon monoxide intoxication: the relation between MR findings and clinical outcome. *J Korean Radiol Soc*. 1999;40:633-638.
- Choi I.S. Carbon monoxide poisoning: systemic manifestations and complications. *J Korean Medical Science*. 2001;16(3):253-61.
- Ernst A., Zibrak J.D. Carbon Monoxide Poisoning. *New England J Med*. 1998;339(22):1603-1608.
- Finelli P.F., Di Mario F.J. Hemorrhagic infarction in white matter following acute carbon monoxide poisoning. *Neurology*. 2004;63(6):1102-1104.
- Goldbaum L.R., Orellano T., Dergal E. Mechanism of the toxic action of carbon monoxide. *Ann Clin Lab Sci*. 1976;6:372-376.
- Juurlink D.N., Stanbrook M.B., McGuigan M.A. Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*. 2000;(2):CD002041.
- Prockop L.D., Chichkova R.I. Carbon monoxide intoxication: an updated review. *J Neurol Sci*. 2007;262:122-130.

Raub J.A., Mathieu-Nolf M., Hampson N.B., Thom S.R. Carbon monoxide poisoning--a public health perspective. *Toxicology*. 2000;145(1):1-14.

Satran D., Henry C.R., Adkinson C., Nicholson C.I., Bracha Y., Henry T.D. Cardiovascular manifestations of moderate to severe carbon monoxide poisoning. *J Amer College of Cardiology*. 2005;45(9):1513-6.

Tomaszewski C., Goldfrank L., Flomenbaum N., Lewin N., Howland M., Hoffman R., Nelson L. Carbon Monoxide. In: Goldfrank's toxicologic emergencies. 7th edition. New York: McGraw-Hill. 2002

Weaver L.K. Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *The New England J Med*. 2009;360(12):1217-25.

## 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., Pfaller M.A. *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 On line Resources, Inc.; c2000-01[updated May 16, 2002; accessed July 9, 2002]. Available at: <http://www.cancer-pain.org/>.

c. Partial website

American Medical Association [online]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated August 23, 2001; accessed August 12, 2002]. AMA Office of Group 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 aceita pela Acta Toxicológica Argentina é livre para os autores, não ter que pagar qualquer custo para publicação ou qualquer das fases anteriores.

### **Direitos autorais**

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

### **Os direitos de publicação**

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

### **Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As **tabelas** deverão ser apresentadas em folha à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos, com as aclarações correspondentes. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando números arábicos entre parênteses e super-índice. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das

colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

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

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

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

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

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

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

**Nomenclatura.** No caso de substâncias químicas será tomada como referência prioritária

as normas da IUPAC. Os organismos serão denominados conforme as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico.

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

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

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

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

#### Exemplos:

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

“Em um consenso geral, seria desejável que a ingestão total de cafeína durante a gravidez supere 300 mg/dia (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser 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

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

**b.** Página de internet

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