

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 25
N° 3
Diciembre 2017

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

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

Se encuentra indexada en los siguientes directorios:

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



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

*Acta
Toxicológica
Argentina*

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión directiva

Presidente

Mirtha M. Nassetta

Vicepresidente

Ricardo A. Fernández

Tesorera

Mirta Ryczel

Secretaria

Julietta S. Borello

Vocales

Fernanda Simoniello

Jorge Zavatti

Patricia Lucero

Vocales suplentes

Ana Irene Cañas

Augusto Piazza

Noemí Reartes

Comité científico

Aldo Sergio Saracco

Silvia Cristina Cortese

María Graciela Bovi Mitre

Gerardo Daniel Castro

Adriana Silvia Ridolfi

Órgano de fiscalización

Daniel González

Patricia Quiroga

Adriana Piñeiro

Tribunal de honor

José A. Castro

Edda C. Villaamil Lepori

Elda Cargnel

Acta Toxicológica Argentina

Director

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

Comité de redacción

Ricardo A. Fernández, *Htal. Infantil Municipal, Fac. Medicina, Univ Católica de Córdoba*

Susana I. García, *Fac. Medicina, UBA; Prog. Nac. Prev. y Control de las Intoxicaciones (PRECOTOX), MSAL de la Nación*

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

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

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

Comité de apoyo

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

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. Donnerwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

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

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

Veniero Gambaro, *Università di Milano, Italia*

Estela Giménez[†], *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

José M. Monserrat, *Universidad de Río Grande, Brasil*

Irma R. Pérez, *Universidad Autónoma de México, México*

Haydée N. Pizarro, *CONICET, Argentina*

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

María M. Salseduc, *Laboratorios Bagó, Argentina*

Carlos Sèvcik, *Inst. Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela*

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

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

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

Eugenio Vilanova Gisbert, *Universidad Miguel Hernández, España*

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

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

INDICE
(CONTENTS)

Artículos originales

Consumo excesivo de cafeína y eventuales poblaciones de riesgo <i>Carnevali de Falke, Susana; Degrossi, María Claudia</i>	67
Distribución de esteroides estrogénicos en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales <i>Ferreira, Aldo P.</i>	80
Evaluación de la toxicidad subcrónica de la variedad colombiana de <i>Smilax</i> <i>sonchifolius</i> (Yacón) en ratas hembra <i>Rodríguez Espinosa, Jhon D.; Torres Wilches, Miguel A.</i>	91
Resúmenes de tesis	
Lombrices de tierra como biomarcadores de efecto y exposición a xenobióticos metálicos (plomo y cadmio) en los diques Cruz de Piedra y La Florida <i>Curvale, Daniela Alejandra</i>	101
Instrucciones para los autores	103

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

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

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

ARTÍCULOS ORIGINALES

Consumo excesivo de cafeína y eventuales poblaciones de riesgo Excessive caffeine consumption and eventual risk populations

Carnevali de Falke, Susana*; Degrossi, María Claudia

Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Fundación H.A. Barceló

*ascarnevali@gmail.com

Recibido: 6 de julio de 2017

Aceptado: 5 de diciembre de 2017

Resumen. La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), es uno de los componentes alimentarios más consumidos y estudiados. Aunque un consumo moderado no implica riesgos para la salud, un ingesta excesiva puede conducir a efectos adversos, tales como ansiedad, irritabilidad, palpitaciones e insomnio. Con el propósito de caracterizar el riesgo para la salud en mujeres adultas de 18 a 70 años en Argentina, se abordaron los siguientes objetivos: determinar el contenido de cafeína en cinco bebidas disponibles en el mercado argentino y con estos datos y otros de fuentes bibliográficas estimar la ingesta media diaria de esta sustancia en dicha población para establecer si existen grupos en riesgo, estudiar la relación de dicha ingesta con el lugar de residencia y determinar el aporte de cada bebida y alimento a la ingesta diaria total. La determinación de cafeína se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). A través de un cuestionario distribuido en la web, se obtuvieron datos de consumo de cafeína de 1947 mujeres que cumplieron el criterio de inclusión. Se encontraron contenidos más altos de cafeína en café expreso (1300 mg/L) y mate cebado (950 mg/L). En el total de la muestra el consumo promedio de cafeína fue de 340 mg/día (5,5 mg/kg/día), excediendo, el 31% de las participantes la ingesta recomendada de 400 mg/día. De las mujeres en edad fértil, el 37% excedió la ingesta de 300 mg/día y el 52% la de 200 mg/día, recomendadas durante la gestación y la lactancia. En el percentil 90 estas mujeres consumieron 851 mg/día y 775 mg/día de cafeína, respectivamente. El mate cebado y el café resultaron los mayores contribuyentes a la ingesta diaria de cafeína en este grupo de mujeres y en la muestra total. Se encontraron diferencias regionales en el consumo del mate cebado, resultando Misiones y Corrientes las provincias de mayores ingestas. Si bien el 68% de las personas entrevistadas consumieron dosis moderadas de cafeína, más de un cuarto de las mujeres en edad reproductiva excedió las ingestas recomendadas para el embarazo y la lactancia.

Palabras claves: Cafeína; Ingesta diaria; Mate; Riesgo

Abstract. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is one of the most consumed and studied food ingredients. Although moderate consumption does not imply health risks, excess intake may lead to adverse effects, such as anxiety, irritability, palpitations and insomnia. In order to characterize the health risk in adult women aged 18 to 70 in Argentina, the following objectives were addressed: to determine the caffeine content in five beverages available in the Argentine market and with these data and others from bibliographic sources estimate the daily intake of caffeine in this population to establish if there are groups at risk; to study the relation of this intake with the place of residence and to determine the contribution of each beverage and food to the total daily intake. The determination of caffeine was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Through a questionnaire distributed on the web, caffeine consumption data were obtained from 1947 women who met the inclusion criteria. Higher caffeine contents were found in espresso coffee (1300 mg/L) and mate "cebado" (950 mg/L). In the sample, mean caffeine intake was 340 mg/day (5.5 mg/kg/day), with 31% of the participants exceeding the recommended intake of 400 mg/day. Of the women of childbearing age, 37% exceeded the intake of 300 mg/day and 52% the intake of 200 mg/day recommended during gestation and lactation. In the 90th percentile, these women consumed 851 mg/day and 775 mg/day of caffeine, respectively. Mate "cebado" and coffee were the major contributors to daily caffeine intake in this group of women and in the total sample. Regional differences were found in the consumption of mate "cebado", being Misiones and Corrientes the provinces with the highest intakes. Although 68% of the people interviewed consumed moderate doses of caffeine, more than a quarter of the women of reproductive age exceeded the recommended intakes for pregnancy and lactation.

Keywords: Caffeine; Daily intake; Mate; Risk

Introducción

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), un componente natural de muchos alimentos y uno de los ingredientes alimentarios más estudiados y consumidos a nivel mundial, se encuentra

naturalmente en hojas, frutos y semillas de varias plantas, como *Coffea arabica*, *Coffea robusta*, *Camellia sinensis*, *Theobroma cacao*, *Cola acuminata*, *Paullinia cupana* e *Ilex*

paraguariensis (Moratalla 2008; Heckman y col. 2010; Barrera-Abascal y col. 2012).

La mayor fuente de cafeína proviene del consumo de bebidas, como café, té, mate, bebidas energizantes, bebidas cola y bebidas chocolatadas. Otros alimentos que la contienen son, el chocolate y productos elaborados a base de éste (snacks) que contribuyen con pequeñas cantidades de cafeína a la dieta (Knight y col. 2004; Heckman y col. 2010).

La cantidad de cafeína contenida en bebidas y alimentos varía dependiendo de la porción, el tipo de producto y el método de preparación. En el té, el mate y el café, la variedad de la planta, las condiciones de crecimiento y del ambiente, el proceso o el método de elaboración utilizado, afectan el contenido de cafeína (IFIC 2008; Heckman y col. 2010).

En cuanto a los efectos de la cafeína sobre la salud humana, según las evaluaciones de riesgo, dosis moderadas de hasta 400 mg/día en adultos sanos, no causa efectos adversos en el sistema cardiovascular y no aumenta el riesgo de cáncer u osteoporosis. A su vez por sus efectos estimulantes sobre el Sistema Nervioso Central, facilita el trabajo intelectual, la capacidad de concentración, la atención y la vigilia, mejora la coordinación psicomotora y reduce la sensación de fatiga (Nawrot y col. 2003). Datos epidemiológicos sugieren que el consumo regular de cafeína puede ayudar a reducir los síntomas asociados con la enfermedad de Parkinson, tiene un efecto favorable sobre la función hepática, aumenta la tasa metabólica y disminuye el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer (endometrial, de colon, de hígado) (Cano-Marquina y col. 2013; González de Mejía y Ramírez-Mares 2014).

La cantidad de cafeína necesaria para producir efectos adversos varía de persona a persona dependiendo del peso, sexo, edad y susceptibilidad individual. Una alta exposición se asocia con un aumento de efectos adversos como náuseas, mareos, disnea, ansiedad, irritabilidad, palpitaciones, insomnio, temblores y depresión (IFIC 2008; Heckman y col. 2010; González de Mejía y Ramírez-Mares 2014). Varios organismos gubernamentales y de evaluación de riesgos, en diferentes países, han establecido valores recomendados para la ingesta diaria de cafeína en diferentes grupos de población. Según las recomendaciones canadienses (Health Canada 2013) y de otras agencias gubernamentales

(Conseil Supérieur de la Santé de la Belgique 2012; Hamburg y Taylor 2014), la ingesta diaria de cafeína no debe superar los 400 mg en la población adulta sana, excepto en las mujeres embarazadas. Otros autores (Thomson y Schiess 2011) han adoptado valores más conservadores (210 mg/día), valor por debajo del cual no se observan efectos relacionados con la ansiedad. Durante el embarazo, por sus potenciales efectos adversos sobre éste y el feto, existen discrepancias en los valores adoptados, desde menos de 200 mg/día (Norwegian Food Safety Authority 2011; ACOG 2016), a menos de 300 mg/día (Health Canada 2013).

Si bien la evaluación de la ingesta de cafeína en otros países reveló que el mayor aporte proviene de la ingesta de café (Penolazzi y col. 2012; Fitt y col. 2013; Zucconi y col. 2013; Mitchell y col. 2014), en nuestro país debido al consumo de yerba mate, además del café, se pueden mostrar otros patrones de consumo en la población adulta, tales como los encontrados por revisión de la literatura en los trabajos de Olmos y col. (2009), Onzari y col. (2010) y Giovanini de Oliveira Sartori y Vieira da Silva (2016). Por lo tanto, para actualizar los datos existentes sobre la exposición a esta sustancia y establecer un precedente clave para la caracterización del riesgo para la salud de esta población, se abordaron los siguientes objetivos: describir el perfil de los participantes en el estudio y las características del consumo de cafeína a través de distintas fuentes dietarias, determinar el contenido de cafeína en cinco bebidas disponibles en el mercado argentino, estimar la ingesta diaria media de cafeína en una población de mujeres adultas y describir a aquellas que exceden las ingestas recomendadas, estudiar la relación de dicha ingesta entre los grupos etarios y el lugar de residencia y determinar el aporte de cada fuente dietaria a la ingesta diaria de cafeína.

Materiales y métodos

Selección de la muestra e instrumento de recolección de datos

Mediante un estudio cuantitativo, descriptivo, observacional y transversal, se recogieron los datos entre agosto de 2015 hasta abril de 2016, utilizando un cuestionario previamente validado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Universitario de Ciencias de la

Salud de la Fundación Barceló, desarrollado sobre la base de un cuestionario similar obtenido por revisión bibliográfica (Zucconi y col. 2013).

La selección de la muestra se realizó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, cuyo criterio de inclusión fue: adultos entre 18 y 80 años, de ambos sexos, residentes en Argentina, que, independientemente de su nacionalidad o nivel educativo respondieran voluntariamente al cuestionario administrado en la web. Se obtuvieron 2974 respuestas, con una tasa de respuesta del 89%, de las cuales se excluyeron aquellas que no cumplían el criterio de inclusión. Una vez excluidas aquellas respuestas que no cumplían el criterio de exclusión o resultaron incompletas, la muestra quedó conformada por 2690 participantes.

El cuestionario, de tipo personal y administración a través de la aplicación de Google Drive (versión libre), garantizó el anonimato de los participantes. El instrumento indagaba sobre: las características socio-demográficas de los participantes (edad, género, nacionalidad, nivel educativo, peso), y sobre la cantidad y frecuencia del consumo de bebidas y alimentos conteniendo cafeína. Las bebidas se agruparon en siete categorías: café (por ejemplo, filtrado, instantáneo), té, bebidas colas, bebidas chocolatadas, bebidas energizantes, mate cocido y mate cebado. Los alimentos consistieron en chocolate y productos elaborados a base de éste (por ejemplo Shot, Block).

Contenido de cafeína en bebidas y alimentos

Se realizó la determinación analítica de cafeína en cinco bebidas, que los participantes señalaron como las más consumidas, de modo de reflejar la concentración de cafeína de estos productos en nuestro mercado. Las bebidas analizadas fueron: café expreso e instantáneo, té, mate cebado y mate cocido.

Para el café expreso se analizaron: muestras tomadas de tres distintas cápsulas utilizadas en la máquina Nespresso con distinto tenor de cafeína y una muestra de café comprado en un bar.

Para el café instantáneo, té, mate cocido y mate cebado se seleccionaron 3 marcas comerciales disponibles en el mercado, preparando las infusiones según las instrucciones del fabricante.

En el caso del mate cebado se realizó una

simulación de las porciones ingeridas por los consumidores, tomando finalmente la concentración media que surge de la recolección de 500 mL, correspondientes a 10 mates grandes conteniendo 50 g de yerba.

La determinación de cafeína se realizó mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC), utilizando un método previamente validado, empleado para cuantificar esta sustancia en bebidas. Se utilizó un Cromatógrafo marca Agilent (Agilent Technologies, Inc) modelo 1200, equipado con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (tamaño de partícula 5,0 μm , diámetro 4,6 mm, longitud 150,0 mm), un inyector automático Termo Agilent 1100/1200, un detector DAD Agilent 1200. Se empleó el software del sistema Rev. B.02.01-SR2 [260] Copyright© Agilent Technologies. El flujo fue de 1,0 mL/min y el volumen de inyección 10 μL .

Para realizar la curva de calibración se utilizó un estándar de cafeína de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) trazable a USP Reference Standard. Las concentraciones de cafeína en las muestras, se calcularon utilizando la ecuación de la recta de regresión (promedio de las áreas vs. concentración de cafeína).

Cada estándar y cada muestra se procesaron por duplicado. Intercaladas, con cada muestra se corrió un estándar interno de cafeína.

Para las bebidas cola, capuchino, chocolate y productos a base de éste, el contenido de cafeína se tomó de fuentes bibliográficas (Olmos y col. 2009; Zucconi y col. 2013). Para las bebidas energizantes se obtuvo información de las etiquetas de los productos. Se utilizó un valor por defecto de 0,3 mg/ml en los casos en que los participantes no se especificaron ninguna marca (Zucconi y col. 2013).

Ingesta diaria de cafeína

Para obtener la ingesta diaria de cafeína (mg/día) de cada participante, se siguió el lineamiento empleado por Zucconi y col. (2013), multiplicando el consumo diario de bebidas o alimentos (en mL ó g) por la concentración media de cafeína en éstos (en mg/mL ó mg/g), obtenida de la determinación analítica en café expreso, café instantáneo, té, mate cebado y mate cocido y de fuentes bibliográficas para el café de filtro, las bebidas cola, las bebidas chocolatadas (Olmos y col. 2009), cappuccino, chocolates y snacks (Zucconi y col. 2013). Luego se sumaron los aportes de todas las fuentes de cafeína y se expresó la ingesta dia-

ria media de cafeína en mg/día y en mg/kg/día teniendo en cuenta el peso corporal informado por cada participante. La ingesta media total de la muestra se obtuvo teniendo en cuenta los datos de todos los participantes.

Asimismo, se calculó la proporción de los participantes que consumen cada fuente de cafeína y la contribución de éstas a la ingesta media total.

Análisis estadístico

Todos los datos recogidos fueron examinados con el programa Excel para Windows® y analizados estadísticamente utilizando el programa Info-stat® para Windows (versión libre, Córdoba, Argentina).

Para la estadística descriptiva se utilizaron frecuencias y porcentajes, utilizando la prueba del Chi-cuadrado de Pearson, con un nivel de confianza del 95%, para comparar diferencias entre grupos etarios y género. Para la ingesta media diaria de cafeína, se utilizaron como medidas de resumen la media, el percentil 90, utilizadas en otras evaluaciones de riesgo (Zucconi y col. 2013; Mitchell y col. 2014). Para comprobar la distribución de un conjunto de datos con el propósito de aplicar los test estadísticos adecuados, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Dada la distribución asimétrica de la variable, se utilizó la prueba de Mann-Whitney, para comparar las diferencias entre dos grupos y el análisis de la varianza no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) para comparar diferencias entre más de dos grupos, ambos con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

Contenido de cafeína en las bebidas y alimentos

La curva de calibración mostró una excelente linealidad con un coeficiente de correlación de 1,000 en el intervalo de la concentración seleccionada. La precisión expresada como coeficiente de variación (CV%) fue del 0,13%. Los resultados de la determinación analítica de cafeína se muestran en la *Tabla 1*. Se encontró que los valores más altos correspondieron al café expreso y mate cebado.

Perfil y características de consumo de la muestra de mujeres

De 2690 encuestados que cumplieron el criterio de inclusión, 1947 (72,4%) fueron mujeres entre 18 a 70 años. De éstas, el 98% declaró

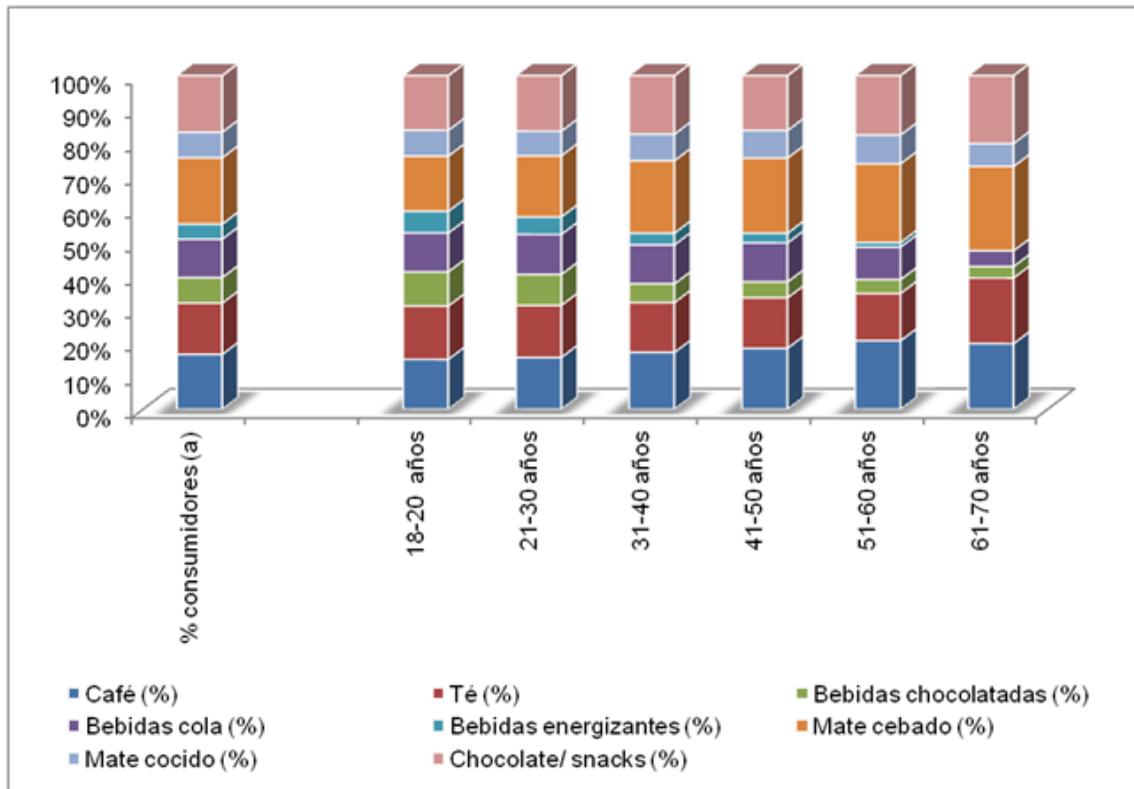
Tabla 1. Contenido de cafeína en alimentos y bebidas según categorías utilizadas en el estudio

Categoría alimentos/ bebidas	Contenido de cafeína (mg/L o mg/100g)		Fuente de los datos
	promedio	Rango	
Café			
Expreso	1300	1110-1650	Análisis por HPLC
Instantáneo	570	440-750	Análisis por HPLC
de Filtro	390	260-530	Olmos y col.(2009)
Cappuccino	250	---	Zucconi y col.(2013)
Té	124	90-150	Análisis por HPLC
Bebidas chocolatadas	40	37-42	Olmos y col.(2009)
Bebidas cola	110	90-120	Olmos y col.(2009)
Bebidas energizantes	---	80-320*	Rótulo del producto
Mate cebado	950	810-1050	Análisis por HPLC
Mate cocido	180	170-200	Análisis por HPLC
Chocolate	18		Zucconi y col.(2013)
Snacks	14		Zucconi y col.(2013)

*Concentración correspondiente a las bebidas energizantes declaradas por el participante en el cuestionario

ser de nacionalidad argentina, el 44% residir en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el conubarno bonaerense, el resto residir en localidades del interior de la Provincia de Buenos Aires y en otras 21 provincias. El 45% expresó haber completado estudios secundarios y el 48% estudios terciarios/universitarios, el 44% estar empleada, el 27% ser estudiante y las restantes dedicarse a otras ocupaciones tales como profesionales, comerciantes, amas de casa, docentes y jubiladas.

Consumo de cafeína e ingesta media diaria
Considerando las diferentes fuentes de cafeína, el 72,8% de toda la muestra consume café, el 67,7% té, el 33,6% bebidas chocolatadas, el 51,0% bebidas cola, el 19,5% bebidas energizantes, el 87,6% de mate cebado, el 33,8% mate cocido y el 75,0% chocolate y snacks. En *la Figura 1* se muestra el porcentaje de consumidoras de las distintas fuentes de cafeína y la distribución de frecuencia de consumo dentro de cada grupo etario, considerando sólo a los consumidores. Analizando estos datos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el consumo de bebidas chocolatadas y bebidas cola donde la proporción más alta de consumidoras se encuentra entre los 18 a 30 años. Para las bebidas energizantes la mayor proporción se encuentra en el grupo de 18 a 20 años. Para el resto de las bebidas y alimentos



(a) Porcentaje de mujeres que consumen cada fuente de cafeína.

(b) Considerando la proporción de consumidores de bebidas y alimentos con cafeína dentro de cada grupo etario.

Figura 1. Variación de peso de todos los grupos de animales a lo largo del periodo de estudio.

no se encontraron diferencias significativas entre los grupos etarios.

La ingesta media de cafeína en el total de las mujeres fue de 340 mg/día y de 5,5 mg/kg/día, tal como se muestra en la *Tabla 2*, que también incluye las ingestas por grupo etario. En el grupo etario de 18 a 40 años la ingesta media diaria fue de 346 mg/día (percentil 90, 680 mg/día). En relación a los grupos etarios, se observó que el grupo de 31 a 40 años presentó ingestas más altas que los de 51 a 70 años y los de 18 a 30 años ($p < 0,05$). Sin embargo entre el grupo mencionado en primer término y el de 41 a 50 años no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Al expresar las ingestas en mg/kg/día, esta observación se mantiene excepto para los más jóvenes (18 a 30 años) que difieren estadísticamente ($p < 0,05$) de los de 51 a 60 años, presentando los primeros las ingestas más altas.

En el total de las mujeres encuestadas el mayor consumo de cafeína provino de las bebidas (99%), siendo los mayores contribuyentes a la ingesta media diaria el mate cebado (55%) y el café (28%), seguidos por las bebidas colas

(7%), el té (6%) y el mate cocido (3%). El aporte de otras bebidas, tales como las bebidas energizantes (0,5%) y alimentos resultó muy bajo (datos no mostrados).

Ingestas medias diarias de cafeína que exceden las ingestas recomendadas

Del total de 1947 mujeres, 605 (31,1%) excedieron la ingesta diaria recomendada de cafeína de 400 mg/día para personas adultas sanas. 716 (36,8%) y 1013 (52,0%) mujeres entre los 18 a 40 años, excedieron las ingestas recomendadas para mujeres en edad fértil de menos de 300 mg/día y 200 mg/día, respectivamente. En la *Tabla 3* se presentan dichas ingestas categorizadas según las distintas fuentes de cafeína. Para aquellas mujeres que excedieron los 400 mg/día, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el consumo de cafeína a partir de café, mate cebado y mate cocido. Sin embargo las mujeres más jóvenes (18 a 20 años) presentaron ingestas más altas que las de 31 a 60 años para el té y las bebidas energizantes, que las de 31 a 70 años para

Tabla 2. Ingesta diaria media de cafeína a partir de todas sus fuentes, según grupo etario (n=1947)

	Ingesta media de cafeína (mg/día)					Ingesta media de cafeína (mg/kg/día)				
	n	media	percentil 90	percentil 95	percentil	p	media	percentil 90	percentil 95	p
Total	1947	340	653	814	-		5,5	10,3	12,9	-
Grupo etario (años)										
18-20	164	341	716	1092	(a) (b)		5,8	12,4	19,1	(b)
21-30	858	337	690	845	(a) (b)		5,5	10,4	13,6	(b)
31-40	488	364	658	795	(c)		5,8	10,7	12,6	(c)
41-50	239	330	604	692	(b) (c)		5,1	9,1	10,8	(b) (c)
51-60	144	299	625	807	(a)		4,4	9,3	11,4	(a)
61-70	54	305	624	827	(a) (b)		4,5	10,0	11,7	(a) (b)

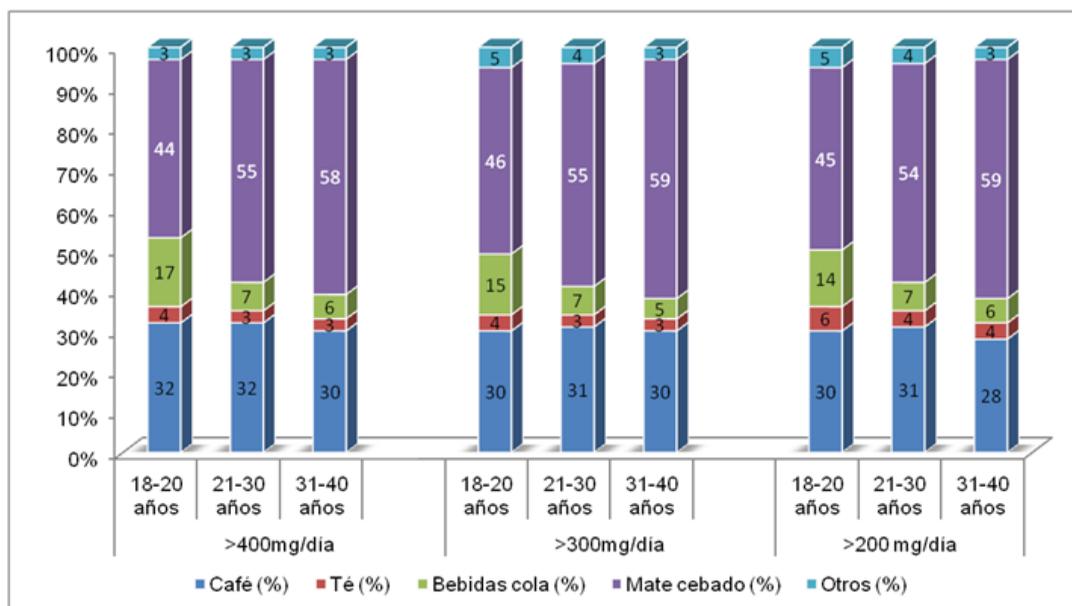
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

las bebidas chocolatadas y snacks y que el resto de los grupos para las bebidas cola. Entre las mujeres en edad fértil que excedieron las ingestas recomendadas, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el consumo de cafeína proveniente del café, mate cebado y mate cocido. Sin embargo se diferencia ($p < 0,05$) el grupo de 18 a 30 años por presentar ingestas más altas que las mujeres de 31 a 40 años para el té, las bebidas cola, las bebidas energizantes y los chocolates/snacks. Para las bebidas chocolatadas el grupo más joven (18 a 20 años)

presenta las ingestas más altas, difiriendo estadísticamente de los otros dos.

Contribución de cada fuente de cafeína a la ingesta media diaria en mujeres en edad fértil que sobrepasan las ingestas recomendadas

En la *Figura 2* se muestra la contribución de las distintas fuentes de cafeína a la ingesta media en los grupos de mujeres de 18 a 20 años, 21 a 30 años y 31 a 40 años. En todos ellos, el mayor aporte a la ingesta media de cafeína correspondió al mate cebado, seguido por el café y las bebidas cola en tercer lugar.



Nota: Otros incluye los aportes de las bebidas chocolatadas, las bebidas energizantes, el mate cocido y chocolate/snacks.

Figura 2. Contribución (%) de cada fuente de cafeína a la ingesta media diaria para las mujeres de 18 a 40 años que sobrepasan las ingestas recomendadas, según grupo etario

Tabla 3. Ingesta diaria media de cafeína total y por fuente dietaria en mujeres que exceden las ingestas recomendadas según grupo etario

Grupo etario (años)	Ingesta media de cafeína (mg/día)																		
	Total		Café		Té chocolátadas		Bebidas cola		Bebidas energizantes		Bebidas cebado		Mate cocido		Mate		Chocolate/Snacks		
	n	m	P90	m	P90	m	P90	m	P90	m	P90	m	P90	m	P90	m	P90	m	P90
Total	605	630	921	194	520	18	55	1,8	7,1	44	110	2,3	6,1	355	570	11,4	36	4,1	9,1
18-20	51	703	1199	228	638	27 ^c	55	3,1 ^c	8,6	118 ^c	457	5,1 ^b	11,4	307	499	8,8	26	6,0 ^b	13
21-30	258	647	970	206	528	18 ^{b,c}	55	2,4 ^{b,c}	8,6	44 ^b	94	2,6 ^{a,b}	8,1	358	594	11,5	36	4,5 ^{a,b}	11
31-40	171	612	854	185	445	14 ^a	55	1,2 ^{a,b}	1,4	37 ^b	110	1,7 ^a	5,7	357	570	12,7	36	3,4 ^a	9,1
41-50	75	561	750	137	342	17 ^{a,b}	55	0,8 ^a	0,7	30 ^b	70	1,3 ^a	5,7	361	570	11,3	36	3,0 ^a	8
51-60	36	624	889	206	620	17 ^{a,b}	55	0,3 ^a	1,4	16 ^a	19	2,4 ^a	0	370	760	9,1	31	3,0 ^a	9,1
61-70	14	630	897	228	775	21 ^{a,b,c}	55	0,8 ^{a,b}	1,4	1,7 ^a	2	0	0	368	736	7,2	36	3,4 ^a	13
Mujeres en edad fértil que sobrepasan ingesta recomendada de 300 mg/día																			
Total	716	544	851	166	421	18	55	2	7,1	39	110	2,4	6,1	301	570	11	36	4,2	9,1
18-20	67	620 ^b	1150	187	582	25 ^b	55	3,0 ^c	8,6	95 ^b	447	6,1 ^b	22,9	287	475	11,1	36	5,7 ^b	13
21-30	382	549 ^a	873	172	456	18 ^b	55	2,2 ^b	8,6	37 ^a	85	2,3 ^{a,b}	6,4	302	570	11,4	36	4,3 ^b	9,3
31-40	267	518 ^a	789	153	352	15 ^a	55	1,0 ^a	1,4	29 ^a	110	1,7 ^a	5,7	304	570	10,7	36	3,6 ^a	9,1
Mujeres en edad fértil que sobrepasan ingesta recomendada de 200 mg/día																			
Total	1013	458	775	135	348	19	55	1,8	4,3	32	79	2,4	6,1	253	475	10,4	36	4,2	10
18-20	95	509	1036	151	389	29 ^c	58	3,1 ^c	8,6	71 ^b	242	5,9 ^b	16,2	232	475	12	51	5,0 ^b	11
21-30	565	452	776	138	378	19 ^b	55	2,0 ^b	8,6	31 ^b	71	2,0 ^b	6,1	246	475	10	36	4,0 ^b	10
31-40	353	454	713	127	315	16 ^a	55	1,0 ^a	1,4	25 ^a	66	1,7 ^a	5,7	269	522	10,7	36	3,6 ^a	9,1

n: número de participantes

m: media

P90: percentil 90

Nota: medias con una letra común no son significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$)**Distribución de las ingestas diarias de cafeína según lugar de residencia en el total de la muestra (n=1947)**

Se excluyó del análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis a diez provincias que presentaron un número muy bajo de participantes (≤ 10). Teniendo en cuenta las distintas localidades, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para las ingestas medias diarias y para aquellas provenientes del té, las bebidas chocolatadas, las bebidas cola, las bebidas energizantes, el mate cocido y el grupo chocolate/snacks.

Sin embargo la diferencia fue significativa ($p < 0,05$) para el café y el mate cebado. Para el café, la Ciudad Autónoma de Buenos Aires

(CABA) y Mendoza difieren significativamente ($p < 0,05$) de las provincias de Misiones, Córdoba y Santa Cruz, presentando las primeras las ingestas más altas.

Para el mate cebado las provincias de Misiones y Corrientes difieren significativamente ($p < 0,05$) de CABA, Gran Buenos Aires y las provincias de San Luis, Santa Fe y Córdoba, presentando las dos primeras las ingestas más altas. La *Figura 3* muestra las ingestas medias diarias de cafeína para cuatro de las bebidas que más contribuyeron a la ingesta media de cafeína para cada lugar de residencia.

El mate cebado fue el mayor contribuyente a la ingesta de cafeína (desde 44% en CABA

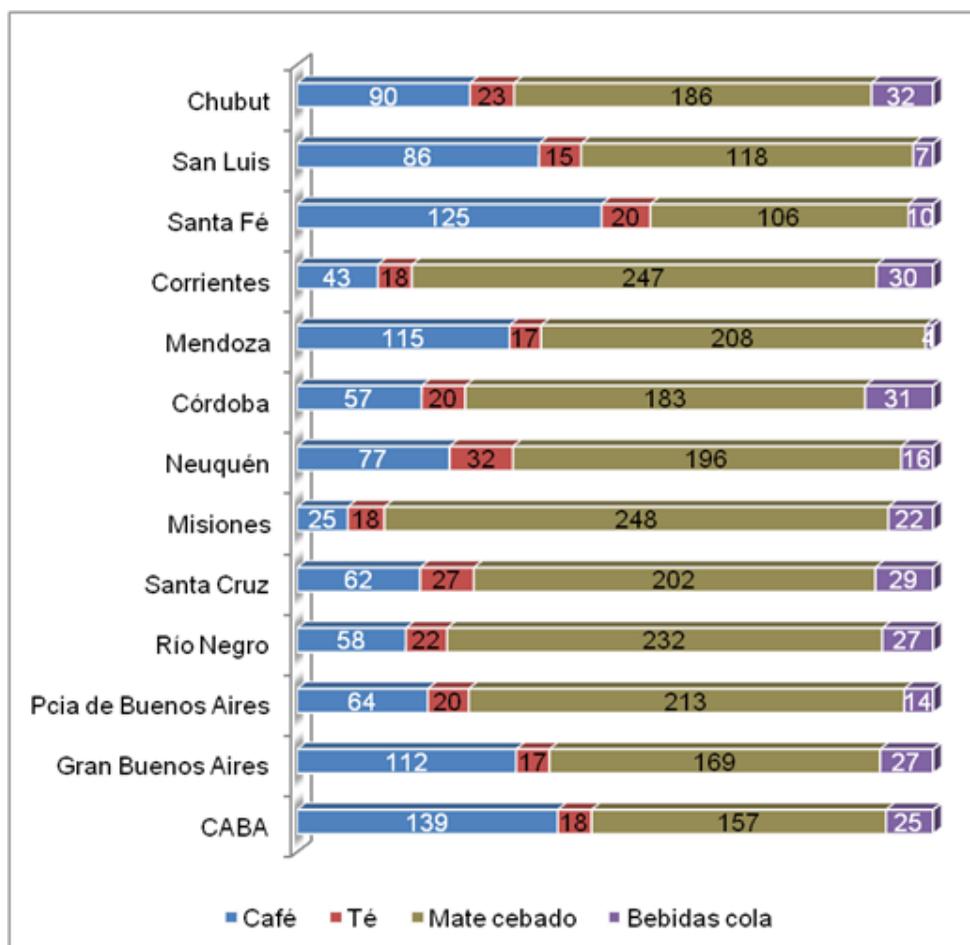


Figura 3. Distribución de la ingesta media diaria de cafeína (mg/día), entre lugares de residencia, para las cuatro principales bebidas que presentan el mayor aporte.

hasta 67% en Corrientes y 74% en Misiones), excepto para la provincia de Santa Fe (38%) donde este lugar lo ocupó el café (45%).

Discusión

La cafeína es uno de los componentes alimentarios más ampliamente consumidos y estudiados. Numerosos estudios abordaron su determinación analítica en distintas infusiones y otras bebidas (McCusker y col. 2003; McCusker y col. 2006; Chin y col. 2008; Rudolph y col. 2012). Los resultados en este estudio mostraron que los valores más altos se encontraron en café expreso y en mate cebado (Tabla 1). Para el café expreso, té y mate cocido en saquitos, los valores encontrados estuvieron dentro del rango (460 a 1590 mg/L, 80 a 170 mg/L y 120 a 180 mg/L, respectivamente) reportado por Olmos y col. (2009) en Argentina, quienes analizaron café expreso comprado en diferentes cafeterías,

cinco muestras de té y 3 muestras de mate cocido de diferentes marcas del mercado argentino. La variabilidad observada en el contenido de cafeína del café, té y mate cocido, puede deberse a la diversidad de marcas disponibles en el mercado, que pueden utilizar diferentes variedades de plantas, disímiles métodos de producción y distintas formas de elaboración (McCusker y col. 2003; Chin y col. 2008; Rudolph y col. 2012). En cuanto al contenido de cafeína encontrado en el mate cebado, es mayor que el reportado por Olmos y col. (2009), probablemente debido a la diferente forma de preparar los extractos para la cuantificación. Sin embargo Colpo y col. (2016), quienes utilizaron un método similar al aplicado en este estudio para preparar los extractos, encontraron en tres marcas argentinas una concentración de cafeína de 966 mg/L, 1081 mg/L y 659 mg/L, teniendo en cuenta el promedio que surge de cebar 10

mates. Según estos autores las marcas uruguayas contienen las mayores concentraciones de cafeína, seguidas por las argentinas y en tercer lugar las brasileñas.

El porcentaje de participantes de este estudio que ingirió cafeína a través de las distintas fuentes, excepto el mate y chocolate/snacks, fueron similares a los presentados por Penolazzi y col. (2012) en una población de adultos de 18 a 60 años en Italia. Sin embargo, el porcentaje de consumidores de bebidas energizantes en el presente estudio resultó superior al informado por otros autores (Penolazzi y col. 2012; Mitchell y col. 2014).

La ingesta diaria media de cafeína encontrada en la muestra total de mujeres, fue similar (301 mg/día) a la reportada por Somogyi (2010) en adultos de 22 años en adelante. Sin embargo, resultó superior al informado en otros estudios en ambos géneros (Olmos y col. 2009; Penolazzi y col. 2012; Fitt y col. 2013; Mitchell y col. 2014). En los estudios de Fitt y col. (2013) y Mitchell y col. (2014), las ingestas más altas se dieron en los grupos de mayor edad (mayor a 65 años y de 50 a 64 años, respectivamente), a diferencia de lo encontrado en el presente trabajo.

El mayor aporte al consumo de cafeína provino de las bebidas en un porcentaje similar encontrado en otros estudios (Somogyi 2010; Fulgoni 2014). A diferencia de éstos, en el presente estudio el mate cebado resultó su principal contribuyente (55%). Cabe notar que en aquellos estudios realizados en Europa y Estados Unidos (Penolazzi y col. 2012; Fitt y col. 2013; Mitchell y col. 2014) no se incluyó al mate. La diferencia en el consumo de cafeína con el estudio realizado en Argentina por Olmos y col. (2009), podría deberse a la naturaleza y composición de la muestra y a que, para calcular la ingesta se utilizó una concentración de cafeína, especialmente en el mate cebado que fue su mayor contribuyente, distinta a la del presente estudio.

El aporte de las bebidas energizantes fue muy bajo, en contraposición con lo informado por Zucconi y col. (2013), en adultos de 18-65 años de varios países europeos, donde dicha contribución fue de un 8%.

Si bien el consumo moderado de cafeína no se asocia a ningún efecto adverso para la salud en adultos sanos, las ingestas superiores a 400 mg/día pueden conducir a diversos trastornos que dependen de la sensibilidad individual (Heckman y col. 2010). Algunos autores

consideran que ingestas por encima de 500-600 mg/día representan un riesgo significativo para la salud y puede ser considerado como un consumo abusivo (Nawrot y col. 2003; Hamburg y Taylor 2014).

En este estudio más del 30% superó esta ingesta recomendada, con un porcentaje similar (33%) al encontrado en Dinamarca por algunos autores (EFSA 2015). En Estados Unidos, Mitchell y col. (2014), informaron ingestas para adultos mayores de 35 años, en el percentil 90, entre 420-467 mg/día, menores a las encontradas en el presente estudio (Tabla 3). En otro estudio se encontraron para adultos de 18 a 65 años, ingestas diarias, en el percentil 95, entre 414-742 mg/día en siete países europeos (EFSA 2015). En las mujeres, una ingesta superior a la señalada puede aumentar el riesgo de sufrir de vejiga hiperactiva y está asociada con un leve deterioro del balance de calcio y de la salud ósea (Nawrot y col. 2003). Durante el embarazo, existen discrepancias en las ingestas recomendadas (Norwegian Food Safety Authority 2011; Conseil Supérieur de la Santé de la Belgique 2012; Health Canada 2013; Hamburg y Taylor 2014; ACOG 2016). A través de la revisión de la literatura, distintos estudios epidemiológicos han reportado conclusiones inconsistentes sobre los efectos de la ingesta de cafeína durante el embarazo, probablemente y entre otras, debido a las dificultades en la estimación de la ingesta de cafeína y, a la evaluación de asociaciones basadas en trimestres individuales más que durante todo el embarazo. Debido a esto, el nivel exacto de ingesta por encima del cual el riesgo es significativamente más alto no está bien caracterizado (Sengpiel y col. 2013; Chen y col. 2014; Chen y col. 2015; Rhee y col. 2015). Muchas mujeres consumen bebidas y alimentos que contienen cafeína durante el embarazo. Esta sustancia, tras la ingestión, se absorbe rápidamente y se transmite fácilmente a través de la placenta al feto. El citocromo P450 1A2, la principal enzima implicada en el metabolismo de la cafeína está ausente en la placenta y el feto. Por otro lado, la tasa de metabolismo de la cafeína disminuye desde el primer al tercer trimestre y la vida media de la cafeína se duplica en la madre durante el embarazo. Esto puede conducir a una mayor exposición del feto a la cafeína ingerida por la madre (CARE Study Group 2008; Jarosz y col. 2012; Chen y col. 2014; Chen y col. 2015; ACOG 2016).

Si bien en este estudio no se consultó a los

participantes sobre su estado de embarazo, la identificación de aquellas mujeres en edad fértil que superan las ingestas recomendadas para el período de gestación y lactancia, puede contribuir a identificar grupos potenciales en riesgo.

El porcentaje de las participantes de 18 a 40 años de este estudio, que excede la ingesta recomendada 300 mg/día, difiere de la reportada por Fitt y col. (2013) donde un 4% de mujeres mayores a 19 años excedieron dicha ingesta. A su vez Mitchell y col. (2014), encontraron que mujeres en edad fértil consumían, en el percentil 90, 228 y 284 mg/día de cafeína, en los grupos de 18 a 24 años y de 25 a 34 años, respectivamente. Knight y col. (2004) informaron que en mujeres en edad reproductiva las ingestas medias fueron de 91-109 mg/día (percentil 90, 228-247 mg/día). Estas ingestas difieren de las encontradas en este estudio para mujeres en edad reproductiva. Esto probablemente se deba a que el mate cebado, que tiene un alto contenido de cafeína, contribuyó con más del 50% a su ingesta media. El mate cebado es una de las infusiones más populares en Argentina, Uruguay, Paraguay y Sur de Brasil y es preparado a partir de las hojas secas de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire), cuyo peculiar método de preparación permite una extracción continua de los compuestos presentes en las hojas secas. Su consumo se ha extendido a otros países, donde se exporta, debido a sus propiedades nutricionales y funcionales atribuidas a la presencia de compuestos bioactivos como polifenoles, xantinas, alcaloides purínicos, aminoácidos, flavonoides, minerales y vitaminas, algunas de las cuales están asociadas con muchas propiedades relevantes, tales como antialérgicas, diuréticas, hipocolesterolemicas y por su actividad antioxidante (Bracesco y col. 2011; Dartora y col. 2011; Holowaty y col. 2014; Valduga y col. 2016).

De acuerdo al análisis realizado por Lysiak (2016) sobre el consumo de yerba mate y su distribución según regiones y provincias de nuestro país, ésta tiene una alta representación sobre el total de bebidas consumidas con una participación del 34% al 50% desde el nivel de ingresos más alto al más bajo. La yerba mate es la bebida por litro más barata, por lo que a participación sobre el total de gasto en bebidas en los hogares va del 9% al 5% para los hogares de ingresos bajos

y altos respectivamente. En el consumo de esta infusión tiene alto impacto las diferencias regionales, donde la región del Noreste es la de mayor consumo. Éste disminuye en los sectores de ingresos altos de las regiones del Gran Buenos Aires y CABA, Noroeste y Cuyo donde el café instantáneo y molido se acercan en participación a la yerba mate. Estas diferencias regionales coinciden con las encontradas en este estudio donde las ingestas más altas para el café se ubicaron en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y Mendoza, mientras que para el mate cebado el mayor consumo de cafeína se encontró en las provincias de Misiones y Corrientes.

El presente estudio permitió caracterizar la ingesta diaria media de cafeína en la muestra, a partir de diferentes fuentes dietéticas, así como la contribución de cada una de ellas a la ingesta total, actualizando los datos existentes en Argentina. En cuanto a las fuentes de cafeína en la dieta, el estudio muestra que el mate cebado y el café son consumidos por la mayoría de los participantes, incluidas las mujeres en edad fértil. Una de las características de las evaluaciones de riesgo, es precisamente identificar grupos poblacionales específicos que pueden estar en un mayor riesgo de efectos adversos relacionados con una ingesta excesiva de cafeína. A este respecto el 68,3% de las mujeres entrevistadas consumieron dosis moderadas de cafeína por debajo de las ingestas recomendadas para una población adulta sana, por lo que no se detectó riesgo significativo para este grupo. Sin embargo más de un cuarto de las mujeres en edad reproductiva excedió las ingestas recomendadas para mujeres embarazadas.

Entre las limitaciones del estudio se encuentra la distribución del cuestionario a través de la web, ya que sólo participarán en él aquellos que tienen acceso a Internet, limitando el número y la calidad de los participantes. Sin embargo, esta modalidad, que es reconocida como un método eficiente para la recolección de datos, permitió la inclusión de diferentes áreas geográficas de nuestro país y llegar a un gran número de personas, con una alta tasa de respuesta. Esto hace que la información recogida sea extremadamente útil para detectar diferentes patrones de consumo, lo cual es esencial para implementar acciones y estrategias de reducción del riesgo.

Una de las fortalezas de este trabajo fue estimar la ingesta de cafeína mediante los da-

tos obtenidos de su determinación analítica en varias bebidas disponibles en el mercado argentino, teniendo en cuenta, especialmente en el mate cebado, la forma de preparación habitualmente utilizada en nuestro país y la ingerida por las participantes.

Una de las dificultades encontradas, fue comparar los resultados con otros estudios, ya que estos o bien se realizaron sobre muestras diferentes o en poblaciones específicas. Asimismo en dichos estudios los grupos etarios fueron catalogados de distinta forma y la evaluación del consumo de cafeína resultó diferente, ya que en algunos casos se utilizó un recordatorio de 24 h y en otros un cuestionario de frecuencia de consumo.

Por último, los resultados obtenidos en este estudio constituyen un antecedente relevante sobre la base del cual los gestores de riesgos pueden identificar el problema, tomar decisiones y proponer acciones para su gestión. Esto proporcionará a los comunicadores de riesgo información valiosa para proponer estrategias que adviertan a los consumidores, especialmente a los grupos vulnerables, sobre los probables efectos adversos derivados de una ingesta excesiva de cafeína de modo de disminuir la exposición a esta sustancia. Asimismo, sería sumamente útil para la comunidad científica y los gestores de riesgo extender este estudio a poblaciones de mujeres embarazadas para obtener una estimación de la real ingesta de cafeína y ampliar los resultados de estudios previos en Argentina.

Bibliografía citada

Barreda-Abascal R., Molina L., Haro-Valencia R., Alford C., Verster J.C. Actualización sobre los efectos de la cafeína y su perfil de seguridad en alimentos y bebidas. Revista Médica del Hospital General de México. 2012;75(1):60-67.

Bracesco N., Sanchez A.G., Contreras V., Menini T., Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. J Ethnopharmacol. 2011;136:378-384.

Cano-Marquina A., Tarín J.J., Cano A. The impact of coffee on health. Maturitas. 2013; 75:7– 21.

CARE Study Group: Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational stu-

dy. BMJ. 2008;337:a2332. Corrections. BMJ. 2010;340:c2331.

Chen L.W, Wu Y., Neelakantan N., Foong-Fong Chong M., Pan A., van Dam R.M. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of pregnancy loss: a categorical and dose-response meta-analysis of prospective studies. J Public Health Nutr. 2015;19(7):1233–1244.

Chen L.W., Wu Y., Neelakantan N., Foong-Fong Chong M., Pan A., van Dam R.M. Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: a systematic review and dose-response meta-analysis. BMC Medicine. 2014;12:174.

Chin, J.M., Merves, M.L., Goldberger, B.A., Sampson-Cone, A., Cone, E.J. Caffeine Content of Brewed Teas. J Anal Toxicol. 2008;32:702-704.

Colpo A.C., Hemerson R., Lima M.E., Pazzini C.E.F., de Camargo V.B., Bassante F.E.M., Puntel R., Silva Ávila D., Mendez A., Folmer V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. Food Chem. 2016;209:185–195.

Colpo A.C., Hemerson R., Lima M.E., Pazzini C.E.F., de Camargo V.B., Bassante F.E.M., Puntel R., Silva Ávila D., Mendez A., Folmer V. Unpublished observations. Data associated with the article Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Conseil Supérieur de la Santé de la Belgique (CSS). [en línea]. Avis du Conseil supérieur de la Santé N° 8689. Utilisation de la caféine dans les denrées alimentaires. Avis du 11 janvier 2012. [consulta 2 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.west-info.eu/files/cafeina.pdf>.

Dartora N., De Souza L.M., Santana-Filho A.P., Lacomini M., Valduga A.T., Gorin P.A.J., Sasaki G.L. UPLC-PDA-MS evaluation of

bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. Food Chem. 2011; 129: 1453–14.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA Panel). Scientific Opinion on the safety of caffeine. EFSA Journal. 2015;13(5):4102, 120 pp.

Fitt E., Pell D., Cole D. Assessing caffeine intake in the United Kingdom diet. Food Chem. 2013;140(3):421-426.

Fulgoni V. Various Aspects of Caffeine Intake in America: Analysis of NHANES. In Institute of Medicine (IOM). Caffeine in Food and Dietary Supplements: Examining Safety: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press. 2014.

Giovanini de Oliveira Sartori A., Vieira da Silva M. Caffeine in Brazil: intake, socioeconomic and demographic determinants, and major dietary sources. Nutrire. 2016;41:11.

González de Mejía E., Ramírez-Mares M.V. Impact of caffeine and coffee on our health. Trends Endocrin Metabol. 2014;25(10):489-554.

Hamburg M., Taylor M.R. The past, present and future of Caffeine regulation in the United States. En: Caffeine in Food and Dietary Supplements: Examining Safety: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press. 2014.

Health Canada, Government of Canada. [en línea]. Health Canada Reminds Canadians to Manage Their Caffeine Consumption. Identification number: RA-34021. [consulta: 2 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://healthy-canadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2013/34021a-eng.php>.

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

Holowaty S.A., Surkan S.A., Trela V.D., Byczko G.D, Schmalko M.E. Variation of Phy-

sicochemical and Sensory Properties during the Aging of Yerba Mate. International J Food Studies. 2014;3:228-2.

International Food Information Council Foundation (IFIC). Caffeine & Health: Clarifying the controversies. IFIC Review. 2008;7(98):1-8.

Jarosz M., Wierzejska R., Siuba M. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol. 2012;160(2):156-60.

Knight C.A., Knight I., Mitchell D.C., Zepp J.E. Beverage caffeine intake in U.S. consumers and subpopulations of interest: estimates from the Share of Intake Panel survey. Food Chem Toxicol. 2004;42:1923–1930.

Lysiak E. Participación de la yerba mate en el consumo argentino de bebidas. INTA Ediciones. Colección Investigación, desarrollo e innovación. Miscelánea N° 74. E.E.A INTA Cerro Azul. 2016.

McCusker R.R., Goldberger B.A., Cone E.J. Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas and Other Beverages. J Anal Toxicol. 2006;30:112-114.

McCusker R.R., Goldberger B.A., Cone E.J. Caffeine Content of Specialty Coffees. J Anal Toxicol. 2003;27:520-522.

Mitchell D.C., Knight C.A., Hockenberry J., Teplansky R., Hartman T.J. Beverage caffeine intakes in the U.S. Food Chem Toxicol. 2014;63:136–142.

Moratalla R. Neurobiología de las metilxantinas. Trastornos Adictivos. 2008;10(3):201-207. Nawrot P., Jordan S., Eastwood J., Rotstein J., Hugenholtz A., Feeley M. Effects of caffeine on human health. Food Addit Contam. 2003;20:1–30.

Norwegian Food Safety Authority. [en línea]. Dietary advice for pregnant women [Kostråd til gravide, in Norwegian]. [consulta 2 de febrero de 2017]. Disponible en: http://www.matportalen.no/rad_til_spesielle_grupper/tema/gravide/.

Olmos V., Bardoni N., Ridolfi A.S., Villaamil Lepori E.C. Caffeine levels in beverages from

Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. *Food Addit Contam.* 2009;26(3):275-281.

Onzari M., Krupitzky H., Cillo F., Cámara K. Consumo de cafeína en deportistas. *Revista electrónica de Ciencias Aplicadas al Deporte.* 2010;3(11):1-9.

Penolazzi B., Natale V., Leone L., Russo P.M. Individual differences affecting caffeine intake. Analysis of consumption behaviours for different times of day and caffeine sources. *Appetite.* 2012;58:971-977.

Rhee J., Kim R., Kim Y., Tam M., Lai Y., Keum N., et al. Maternal Caffeine Consumption during Pregnancy and Risk of Low Birth Weight: A Dose-Response Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0132334.

Rudolph E., Färbing A., König J. Determination of the caffeine contents of various food items within the Austrian market and validation of a caffeine assessment tool (CAT). *Food Addit Contam.* 2012;29(12):1849-1860.

Sengpiel V., Elind E., Bacelis J., Nilsson S., Grove J., Myhre R., Haugen M., Meltzer H.M., Alexander J., Jacobsson B: Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with birth weight but not with gestational length: results from a large prospective observational cohort study. *BMC Medicine.* 2013;11:42.

Somogyi L.P. Caffeine Intake in the U.S. Population. [en línea]. 2010 [consulta 11 de marzo 2017]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CFSAN/CFSANFOIAElectronicReadingRoom/UCM333191.pdf>.

The American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Committee Opinion No. 462 (Reaffirmed 2016): moderate caffeine consumption during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2010;116:467-468.

Thomson B., Schiess S. Risk Profile: Caffeine in Energy Drinks and Energy Shots. Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand Food Safety Authority. 2011 Project CFS/09/04.

Valduga A.T, Gonçalves I.L, Piovezan Borges A.C, Mielniczki-Pereira A.A, Picolo A.P. Cytotoxic/antioxidant activity and sensorial acceptance of yerba mate development by oxidation process. *Acta Scientiarum. Technology.* 2016;38(1):115-121.

Zucconi S., Volpato C., Adinolfi F., Gandini E., Gentile E., Loi A., Fioriti L. Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks. European Food Safety Authority Supporting Publications [en línea]. 2013 [consulta 11 de mayo 2016]; EN-394: [190 p.]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/394e.htm>.

Distribución de esteroides estrogénicos en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales

Distribution of estrogenic steroids in municipal wastewater treatment plants

Ferreira, Aldo P.

Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Departamento de Direitos Humanos, Saúde e Diversidade Cultural. Avenida Brasil, 4036, sala 905. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ Cep: 21.041-361.

aldopachecoferreira@gmail.com

Recibido: 21 de junio de 2017

Aceptado: 3 de noviembre de 2017

Resumen. En la actualidad, existe una preocupación creciente por la presencia de estrógenos en el medio acuático, donde pueden ser introducidos a partir de aguas residuales después de su eliminación incompleta en las plantas de tratamiento. Las aguas residuales sistemáticamente reciben estrógenos naturales y sintéticos, y por lo tanto una comprensión más profunda de la suerte de ellos en el medio ambiente es necesaria. Se evaluaron los niveles de estrógenos en los efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs) Penha e Ilha do Governador, ambos de tipo convencional de flujo continuo de lodo activado con aireación prolongada. Fue utilizado como el parámetro de determinación de algunos compuestos de interés como estrógenos naturales [estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3)] y sintéticos (17 α -etinilestradiol (EE2)]. Las muestras individuales se recogieron posteriormente al tratamiento de cada PTAR y después de los procedimientos de laboratorio se realizó la determinación de estrógenos basado en la extracción en fase sólida (SPE) y la cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Las concentraciones fueron de: 0,7 a 5,2 $\mu\text{g/l}$ y de 0,5 a 5,6 de E1; 0,9 a 7,7 y 1,2 a 9,2 $\mu\text{g/l}$ para E2; 2,01 a 6,09 y 1,07 a 4,08 $\mu\text{g/l}$ para EE2 en PTAR Penha y PTAR Ilha do Governador, respectivamente. La capacidad de eliminación de estrógenos fue eficaz, pero denota que la eliminación sistemática de la población es en la actualidad alta. Se recomienda instalar mecanismos para mitigar el consumo exagerado de estas sustancias o implementar una eliminación completa más eficaz.

Palabras clave: Estrógeno; Planta de tratamiento de aguas residuales; Contaminación ambiental; Salud pública

Abstract. Currently, there is a growing concern over the presence of estrogens in the aquatic environment, where they can be introduced from wastewater after their incomplete elimination in the treatment plants. Wastewater systematically receives natural and synthetic estrogens, and thus a deeper understanding of the fate of them in the environment is extremely necessary. It was evaluated estrogen levels in the effluent from the Sludge Wastewater Treatment Plants (SWTPs) Penha and Ilha do Governador, both of type conventional continuous-flow activated sludge with extended aeration. The determination of some target compounds as natural estrogens was used as the evaluation parameter [estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and synthetic (17 α -ethinylestradiol (EE2)]. Individual samples were collected posterior treatment of each SWTP, and after laboratory procedures, the determination of estrogens was performed by a method based on solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). Concentrations ranged from 0.7 to 5.2 $\mu\text{g/l}$ and from 0.5 to 5.6 for E1; 0.9 to 7.7 and 1.2 to 9.2 $\mu\text{g/l}$ for E2; 2.1 to 6.9 and 1.7 to 4.8 $\mu\text{g/l}$ for EE2 at SWTPs Penha and Ilha do Governador, respectively. The removal capacity of estrogens despite its effectiveness denotes that the systematic elimination by the population is high nowadays and urging mechanisms to mitigate the exaggerated consumption or to implement most effective complete removal.

Keywords: Estrogen; Wastewater treatment plant; Environmental pollution; Public health

Introducción

El desarrollo de las actividades antrópicas, como centros urbanos, industrias y la agropecuaria, no se ha llevado en cuenta las limitaciones y los trabajos en el medio ambiente. En consecuencia, cada vez más surgen impactos ambientales, siendo muchos de ellos de gran magnitud y/o irreversibles (Filby y col. 2007,

Mierzwa y col. 2009, Saeed y col. 2017). Sin embargo, la preocupación por cuestiones ambientales ha aumentado significativamente en las últimas décadas.

En los últimos años los contaminantes emergentes presentes en aguas residuales en concentraciones del orden de ng/l o $\mu\text{g/l}$ han des-

pertado interés en la comunidad científica por presentar potencialidad para ejercer efectos en humanos y animales (Atkinson y col. 2012). Entre los contaminantes emergentes presentes en aguas residuales, se destacan los estrógenos naturales estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estríol (E3) y el sintético, 17 α -etinilestradiol (EE2), que han sido motivo de preocupación debido a gran cantidad lanzada diariamente en el medio ambiente, ya que son desreguladores endocrinos que poseen alta estrogenicidad, e incluso en bajas concentraciones pueden causar efectos adversos en organismos (Ying y col. 2002, Bila y Dezotti 2007, Mierzwa y col. 2009).

Algunas hormonas estrogénicas son naturalmente secretadas por mujeres y también por hombres, pero en cantidades medias diarias menores. La literatura destaca que las mujeres en menstruación secretan diariamente cierta cantidad de E1, E2 y E3, siendo estos valores casi 100 veces mayores durante la gestación (Carballa y col. 2004, Bila y Dezotti 2011; Aquino y col. 2013). E2 se considera el estrógeno natural más potente, seguido de sus metabolitos E1 y E3 (Castro 2002).

Además de los efectos sobre el desarrollo y función reproductiva, la exposición a estos contaminantes en efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) se ha asociado con efectos adversos más amplios para la salud, incluyendo daños genotóxicos (Gravato y Santos 2003, Liney y col. 2006), inmunosupresión (Hoeger y col. 2005), actividad alterada de las enzimas de biotransformación hepática fase I / fase II (Gravato y Santos 2003, Hoeger y col. 2005, Gagne y col. 2006) y nefrotoxicidad (Liney y col. 2006). Además, se verificó que algunos de estos efectos ocurren en concentraciones de estrógenos considerablemente menores que aquellas que causan la feminización del sistema reproductivo (Liney y col. 2006). La probabilidad de que los contaminantes de PTARs afecten la salud es una preocupación significativa. Por ejemplo, la inmunosupresión puede conducir a una mayor susceptibilidad a la enfermedad; la capacidad metabólica alterada puede llevar a la acumulación tóxica de contaminantes o a la producción de metabolitos reactivos; y daños al ADN pueden resultar en mortalidad embrionaria, anomalías en el desarrollo y/o cáncer (Yasuda y col. 2017).

Con el fin de eliminar sustancias indeseables o transformarlas en otras aceptables según establecido en la legislación brasileña (Brasil

2011) y no alterar los parámetros de calidad del cuerpo hídrico receptor, el efluente sanitario debe pasar por un sistema de tratamiento (Johnson y Chen 2017). Actualmente existen diversos métodos y niveles de tratamiento que se pueden emplear en PTARs y estos procesos se pueden clasificar en: físicos, químicos y biológicos. Los tres procesos actúan en conjunto de modo que la transformación de un proceso de tratamiento influenciará en los demás (Ferreira y col. 2008).

Existen ahora considerables evidencias de estudios de campo y de laboratorio de los efectos sobre la reproducción por la exposición a estrógenos ambientales presentes en efluentes, en particular los estrógenos naturales E1, E2, E3 y estrógenos sintéticos EE2 (Ahmed 2000, Ferreira y col. 2008, Muller y col. 2008). Los estudios en sistemas de mamíferos mostraron que algunos estrógenos (y/o sus metabolitos) también tienen, por ejemplo, propiedades genotóxicas y propiedades inmunotóxicas (Adeel y col. 2017).

Los estrógenos, principalmente E2 es responsable de la formación de las características femeninas, así como EE2 es el principal estrógeno sintético encontrado en las píldoras anticonceptivas y aplicadas en terapias de reposición hormonal. Por poseer alto potencial estrogénico han sido clasificados como los mayores responsables en provocar alteraciones endocrinas en organismos presentes en aguas superficiales. Estos compuestos se han detectado sistemáticamente en efluentes de PTARs por el hecho de ser eliminados parcialmente durante el proceso de tratamiento (Moraes y col. 2008, Johnson y Chen 2017).

Conforme el esquema demostrado en la *figura 1*, de forma general, las PTARs reciben la alcantarilla *in natura* y la somete a una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que tienen por objetivo eliminar diversas sustancias indeseables, posibilitando así su retorno al medio ambiente con características sanitarias más adecuadas (Bento y col. 2005, Falcioni y col. 2005, Ferreira y col. 2008). Además, las diferentes configuraciones y condiciones operativas de diversas PTARs pueden influir en los mecanismos de adsorción, fotodegradación, volatilización y transformaciones químicas y/o biológicas de los compuestos (Suárez y col. 2008). Aun así, son raras las investigaciones que relacionaron parámetros operacionales y físico-químicos con la remoción de los estrógenos en PTAR.

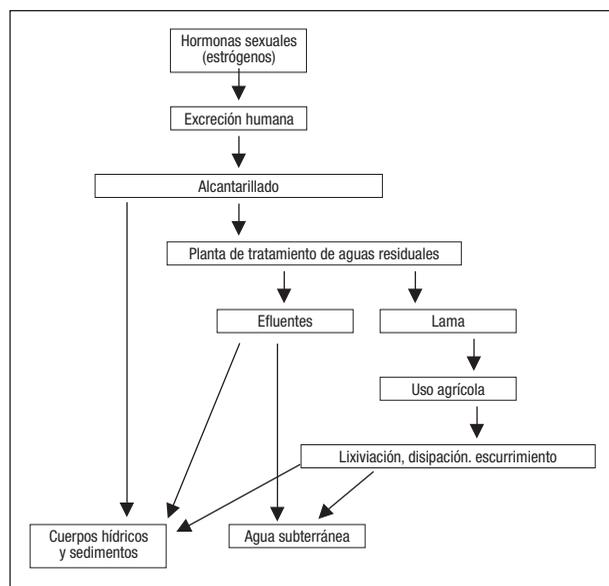


Figura 1. Representación esquemática de la principal vía de entrada de estrógenos sexuales en sistemas acuáticos. Fuente: Reis Filho y col. 2006.

Estrógenos: aspectos de encuadramiento y definiciones

El sistema endocrino es un mecanismo complejo que coordina y regula la comunicación entre las células, constituido por combinaciones de glándulas y hormonas, siendo responsable de las funciones biológicas normales, como la reproducción, desarrollo embrionario, crecimiento y metabolismo (Wirsch y Thomas 2010). Las hormonas son mensajeros químicos que responden por la comunicación entre diferentes tipos de células, las cuales identifican las hormonas a través de receptores que son estructuras proteicas especializadas en reconocimiento molecular (Slabaugh y Seager 2007). Después de la aproximación e interacción (hormona-receptor) ocurre una serie de reacciones bioquímicas, llevando a respuestas biológicas específicas (Witorsch y Thomas 2010, Eick y col. 2012).

Los estrógenos se utilizan hoy en día en la fabricación de píldoras anticonceptivas y esto lleva a una preocupación acerca de la llegada de estos compuestos a ambientes acuáticos, así como sus posibles impactos. A pesar de que las hormonas naturales poseen una vida media de aproximadamente dos a diez días, que es relativamente corta, los estrógenos naturales son continuamente lanzados en el ambiente y esto les concede un carácter de persistencia (Ying y col. 2009). Los estrógenos artificiales persisten en el medio ambiente, pues se acumulan

en suelo, sedimentos ya lo largo de la cadena trófica (Ying y col. 2002, Hoeger y col. 2005). Entre las hormonas sexuales, los estrógenos vienen recibiendo mayor atención por ser compuestos extremadamente activos biológicamente y están relacionados a la etiología de varios tipos de cáncer (Eick y col. 2012). Los estrógenos naturales E1, E2, E3, y el sintético EE2, desarrollado para uso médico en terapias de reposición y métodos anticonceptivos, son los que despiertan mayor preocupación, tanto por la potencia como por la cantidad continua introducida en el ambiente. Estas hormonas poseen la mejor conformación reconocida por los receptores y, por lo tanto, son considerados responsables de la mayoría de los efectos disruptores desencadenados por su presencia en los efluentes (Stumpf y col. 1999, Aerni y col. 2004, Atkinson y col. 2012). Johnson y col. (2000) investigaron las cantidades diarias excretadas de los estrógenos naturales E2, E1, E3 y de EE2 en las píldoras orales anticonceptivas y estimaron las excreciones diarias de estrógenos por humanos. Esta estimación se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Excreción diaria (µg) per capita de estrógenos por humanos (Johnson y col. 2000)

Categoría	Estrona	17β-Estradiol	Estriol	17α-Etinilestradiol
	E1	E2	E3	EE2
Hombres	3,9	1,6	1,5	-
Mujeres menstruando	8	3,5	4,8	-
Mujeres en la menopausia	4	2,3	1	-
Mujeres embarazadas	600	259	6000	-
Mujeres que usan anticonceptivos	-	-	-	35

El lanzamiento de aguas residuales sanitarias en cuerpos receptores sin tratamiento, o parcialmente tratados, sigue siendo la principal causa de la contaminación de recursos hídricos (Ternes y col. 1999, Tollefsen y col. 2007, Saeed y col. 2017). Toneladas de sustancias sintéticas y naturales se descargan anualmente en el medio ambiente, de las cuales un número considerable son disruptores endócrinos (Ying y col. 2009, Zorita y col. 2009). Además de estar asociados a los efectos en el sistema endócrino,

algunos son también persistentes, lipofílicos, bioacumulativos y tienen baja presión de vapor, lo que facilita la dispersión y difusión en el ambiente (Johnson y Chen 2017). La *tabla 2*

presenta un resumen sobre las concentraciones de E1, E2, EE2 y E3 encontrados en las alcantarillas sanitarias de PTARs de diferentes países.

Tabla 2. Concentraciones en ng/l de estrógenos detectados en alcantarillas domésticas

Estrógeno	País	Alcantarillado no tratado	sanitario tratado	Referencias	
E1	Alemania	27	9	Ternes y col. 1999	
	Brasil	40	n.d.		
	Noruega	25	3	Tollefsen y col. 2007	
	Brasil	n.d.	< 500	Souza 2008	
	Francia	n.d.	6-119	Muller y col.2008	
	Brasil	33737	955	Moura 2009	
	Suecia	14,5	3	Zorita y col.2009	
	Australia	n.d.	9,12-32,22	Ying y col.2009	
	Japón	21-68	0,6-80	Hashimoto y Murakami 2009	
	Estados Unidos	n.d.	3-6	Nelson y col.2011	
	España	< 130	< 0,6	Cases y col.2011	
	Corea del Sur	13-52	1-79	Sim y col. 2011	
	Canadá	35-104	11,2-370	Atkinson y col.2012	
	China	42,2-110,7	3,8-30,4	Ye y col.2012	
E2	Alemania	15	n.d.	Ternes y col.1999	
	Brasil	21	n.d.		
	Canadá	n.d.	6		
	Noruega	12	< 3	Thomas y col.2007	
	Brasil	n.d.	< 3	Souza 2008	
	Francia	n.d.	13-28	Muller y col.2008	
	Brasil	690	102	Moura 2009	
	Suecia	3,2	< 1,6	Zorita y col.2009	
	Australia	n.d.	1,37-6,35	Ying y col.2009	
	Japón	5,8-12	< 5	Hashimoto y Murakami 2009	
	Estados Unidos	n.d.	< 2	Nelson y col.2011	
	Corea del Sur	17	n.d.	Sim y col 2011	
	Canadá	24,7-66,9	26,7	Atkinson y col.2012	
	China	7,4-32,7	1,9	Ye y col.2012	
EE2	Alemania	n.d.	1	Ternes y col.1999	
	Canadá	n.d.	9		
	Noruega	< 3	< 3	Thomas y col.2007	
	Brasil	n.d.	< 3	Souza 2008	
	Francia	n.d.	20	Muller y col.2008	
	Brasil	180	100	Moura 2009	
	Suecia	< 10	< 10	Zorita y col.2009	
	Australia	n.d.	0,11-1,20	Ying y col.2009	
	España	< 11	< 11	Cases y col. 2011	
	Estados Unidos	n.d.	< 2	Nelson y col.2011	
	Canadá	0,5-5,7	1-9,8	Atkinson y col.2012	
	China	8,6-40,9	n.d.	Ye y col.2012	
	E3	Noruega	128	< 3	Thomas y col.2007
		Francia	n.d.	19-111	Muller y col.2008
Corea del Sur		46-1130	160-273	Sim y col 2011	
China		126,9-845,6	7,7-11	Ye y col.2012	

n.d. – no detectado; E1 = estrona; E2 = 17 β estradiol; EE2 = 17 α etinilestradiol; E3 = estriol

En este artículo, se propone analizar un estudio cuantitativo de E1, E2, EE2 y E3 en el efluente de PTARs Penha e Ilha do Governador. Se pretende, así, evaluar el desempeño y detección de estrógenos, discutiendo un mejor control del proceso y los potenciales impactos causados al ambiente ya la salud pública.

Materiales y métodos

Caracterización de las PTARs

Las PTARs Penha e Ilha do Governador son sometidas a los siguientes parámetros operativos: determinación del contenido en sólidos, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5), la demanda química de oxígeno (DQO) y el pH. Los residuos sólidos comprenden los sólidos disueltos y en suspensión. Todos estos sólidos pueden dividirse en volátiles y fijos, siendo los volátiles, por lo general, productos orgánicos y los fijos materia inorgánica o mineral.

La PTAR-Penha opera con biofiltros y lodos activados, tratando un caudal alrededor de 1.600 l/s. La PTAR-Ilha do Governador opera con lodos activados, tratando un caudal alrededor de 525 l/s.

Muestreo

El muestreo se realizó al final de la línea de tratamiento de las PTARs Penha e Ilha do Governador. Se recogieron un volumen de 1l de muestra para los análisis cromatográficos en frasco de vidrio ámbar, utilizando 5 ml de metanol para su conservación. Los frascos eran debidamente lavados y acondicionados en telgopor con hielo. Se adoptó un tiempo máximo de conservación de las muestras de 48 horas, mantenidas en refrigeración hasta la realización de los análisis.

Durante las 12 horas programadas para la obtención de muestras, entre las 8h y las 20h, se obtuvieron dos muestras de PTAR cada semana, a lo largo de los meses de julio y agosto de 2016, por el hecho de que en esos meses es baja la pluviosidad y, consecuentemente, posibilita la detección de los analitos a investigar con mayor exactitud. Las muestras recogidas se colocaron en recipientes volumétricos de 0,5 l y el pH fue ajustado a 3,0 con unasgotas de ácido clorhídrico calidad p.a. Posteriormente se realizó la filtración de la muestra en membranas de fibra de vidrio de 0,45 µm (Whatman GF/B), para posterior extracción en fase sólida (SPE). Los resultados expresan el contenido de cada estrógeno identificado.

Análisis de laboratorio

Después de la recolección, las muestras fueron transportadas al laboratorio en maletas térmicas refrigeradas, y luego fueron filtradas por medio de una malla de 230 µm para retener partículas mayores y con filtros de fibra de vidrio Macherey-Nagel, MN GF-3, porosidad de 0,60 µm.

Para el análisis de los compuestos E1, E2, E3 y EE2 se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1200 Series, compuesto por un sistema cuaternario de bombas LC-10AT, módulo controlador SCL-10A, desgasificador DGV-14A, horno de columna CTO-10AS, auto-inyector SIL-10AF y detector de arreglo de diodos (DAD) SPD-M10A. El sistema fue controlado por el programa Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). La separación se realizó en una columna Shim-Pack RP-18e (150 x 4,6 mm, d.i. 5 µm), la cual fue protegida por una pre-columna Shim-Pack G-ODS (10 x 4,0 mm, d.i. 5 µm), ambas de Shimadzu (Kyoto, Japón). La metodología (Wang y col. 2008), fue optimizada y adaptada para posterior análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplada a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). La columna se mantuvo en 40 °C, el tiempo de la corrida fue de 62 minutos, y la inyección se realizó en el cromatógrafo en un volumen de 20 µl.

Validación del método analítico

La validación del método analítico se obtuvo mediante la evaluación de los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud, límites de detección y cuantificación, y repetibilidad.

La selectividad del método cromatográfico fue evaluada por la observación de ausencia de picos en la región del tiempo de retención del analito de interés. Para ello, se inyectó las muestras de blanco sin fortificación y blanco fortificado obtenido con agua ultra pura.

La linealidad fue evaluada por la respuesta obtenida en función de la concentración del analito, la cual fue estudiada en las concentraciones de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 y 4,0 µg/l, inyectadas en triplicada. Después de las inyecciones se calcularon el promedio de las 47 áreas, la estimación de la desviación estándar relativa (DER), o coeficiente de variación (CV), la estimación de la desviación estándar y la ecuación de la regresión lineal de la curva analítica para cada analito.

El proceso utilizado para evaluar la exactitud fue realizado por medio de ensayos de recu-

peración. Las muestras de agua ultra pura fueron fortificadas y extraídas según el método, en las concentraciones de 1,0, 2,0 y 3,0 $\mu\text{g/l}$ y cuantificadas por HPLC-DAD.

Los límites de detección (LD) fueron determinados por la inyección de la menor concentración del patrón mix de las hormonas. Los límites de cuantificación (LQ) para cada una de las hormonas se determinaron utilizando el primer nivel de concentración de la curva analítica, utilizando una solución mixta del patrón que contenía E3, EE2 y E2 en la concentración de 0,5 $\mu\text{g/l}$.

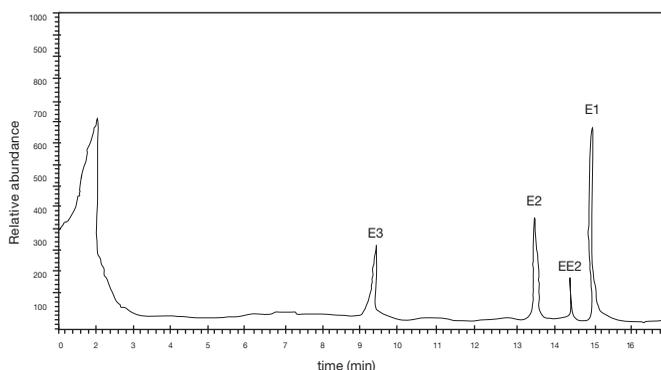
Para la evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico, una misma muestra de un patrón a 1,0 $\mu\text{g/l}$ fue inyectada tres veces, en las mismas condiciones de operación y en el mismo día.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Origin 7.5 (OriginLabCorporation).

Resultados

Para verificación de la detección de los analitos investigados, la *figura 2* presenta el cromatograma de separación obtenido para los patrones de hormonas inyectadas en concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ para E1 y 100 ng/ml para E2, EE2 y E3 en el sistema cromatográfico.



E1 = estrona; E2 = 17 β estradiol; EE2 = 17 α etinilestradiol; E3 = estriol

Figura 2. Cromatograma obtenido de patrones de los estrógenos E1, E2, EE2 y E3

Los resultados obtenidos de los componentes, a partir de análisis de las muestras de agua de los efluentes recogidos al final de la línea de tratamiento de las PTARs Penha e Ilha do Governador, se presentan en las *tabla 3* y

tabla 4 utilizando la metodología HPLC-DAD. No hubo detección de E3 y esto puede estar asociado a la menor interacción de este analito con la fase estacionaria del SPE, caracterizada por interactuar por fuerza de van der Waals, lo que favorece la retención de analitos menos polares, siendo el E3 el más polar de los 4 estrógenos analizados.

Las concentraciones de los analitos evaluados tuvieron como promedio para las aguas de la PTAR Penha: E1 - 2,76 $\mu\text{g/l}$, E2 - 3,77 $\mu\text{g/l}$ y EE2 - 4,08 $\mu\text{g/l}$. Para las aguas de la PTAR Ilha do Governador: E1 - 2,24 $\mu\text{g/l}$, E2 - 4,34 $\mu\text{g/l}$ y EE2 - 3,65 $\mu\text{g/l}$. Las concentraciones variaron de: 0,7 a 5,2 $\mu\text{g/l}$ y de 0,5 a 5,6 para E1; 0,9 a 7,7 y 1,2 a 9,2 $\mu\text{g/l}$ para E2; 2,1 a 6,9 y 1,7 a 4,8 $\mu\text{g/l}$ para EE2 en las aguas de las PTARs Penha e Ilha do Governador, respectivamente.

Discusión

La remoción de contaminantes durante el tratamiento de aguas residuales busca mejorar la depuración del efluente de acuerdo al patrón de calidad vigente. El nivel de eliminación de los contaminantes está vinculado al nivel de tratamiento, así como la eficiencia del proceso. Las transformaciones y la degradación biológica pueden ocurrir aeróbicamente, por oxidación biológica en lodos activados y filtros biológicos, o anaerobiamente en sistemas de alcantarillado o digestores de lodo anaeróbico (Carballa y col. 2004). Los sistemas compuestos por laguna de aireación, sedimentación y lodo están entre los más utilizados durante el tratamiento de efluentes en las PTARs brasileñas (Bento y col. 2005). Entretanto, la no existencia de un programa de monitoreo específico en las PTARs, imposibilita el cálculo de las cantidades de estrógenos que ingresan al efluente y las que son removidas, fundamental para determinar el comportamiento de esas sustancias durante el paso por las varias etapas de tratamiento.

Los estudios de eliminación de fármacos en PTARs brasileñas son raros y espaciados. Stumpf y col. (1999) y Ternes y col. (1999) fueron los primeros en reportar la presencia de hormonas, antiinflamatorios y anti-lipémicos en aguas de alcantarillas, efluentes y Reis Filho y col. (2006) en aguas de ríos en el Estado de Río de Janeiro.

En la literatura internacional, Korner y col. (2000) investigaron la remoción de la actividad estrogénica del efluente doméstico en una PTAR en Alemania. Se comprobó que 90% de

Tabla 3. Análisis de concentraciones de estrógenos ($\mu\text{g/l}$) en aguas del efluente final, PTAR Penha

Componente	PTAR Penha											
	Análisis											
	N total	X	DP	SE	Lower 95% CI of Mean	Upper 95% CI of Mean	Suma	Valor mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor máximo
E1	7	2,75714	1,78219	0,6736	1,1089	4,40539	19,3	0,7	1,1	3,4	3,9	5,2
E2	7	3,77143	2,27062	0,85821	1,67146	5,8714	26,4	0,9	2,25	3,7	4,8	7,7
EE2	7	4,08571	1,97352	0,74592	2,26052	5,91091	28,6	2,1	2,7	3,2	5,5	6,9

E1 = estrona; E2 = 17β estradiol; EE2 = 17α etinilestradiol; E3 = estriol; X - media aritmética; DP - desviación estándar; Se - Error estándar; Lower 95% CI of Mean- límite inferior del intervalo de confianza para la media; Upper 95% CI of Mean- límite superior del intervalo de confianza para la media; Q1 – primero cuartil; Q3 – tercero cuartil

Tabla 4. Análisis de concentraciones de estrógenos ($\mu\text{g/l}$) en aguas del efluente final, PTAR Ilha do Governador

Componente	PTAR Ilha do Governador											
	Análisis											
	N total	X	DP	SE	Lower 95% CI of Mean	Upper 95% CI of Mean	Suma	Valor mínimo	Q1	Mediana	Q3	Valor máximo
E1	7	2,24286	1,86356	0,70436	0,51936	3,96636	15,7	0,5	1,05	1,3	3,1	5,6
E2	7	4,34286	2,6324	0,99495	1,9083	6,77741	30,4	1,2	3,1	3,3	5,25	9,2
EE2	7	3,65714	1,19702	0,45243	2,55009	4,7642	25,6	1,7	2,9	4,1	4,6	4,8

E1 = estrona; E2 = 17β estradiol; EE2 = 17α etinilestradiol; E3 = estriol; X - media aritmética; DP - desviación estándar; Se - Error estándar; Lower 95% CI of Mean- límite inferior del intervalo de confianza para la media; Upper 95% CI of Mean- límite superior del intervalo de confianza para la media; Q1 – primero cuartil; Q3 – tercero cuartil

la actividad estrogénica fue removida y sólo 2,8% fue encontrada en el lodo biológico, concluyendo que la mayor parte de las sustancias responsables de la estrogenicidad del desagüe doméstico fue de hecho biodegradada y no adsorbida en las partículas sólidas o en el lodo biológico.

Ternes y col. (1999) realizaron el monitoreo de estrógenos naturales y del anticonceptivo sintético, EE2, en las PTARs Penha, Río de Janeiro, Brasil. En el alcantarillado doméstico, los estrógenos E2 y E1 se detectaron en concentraciones de 0,021 y 0,04 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. Las tasas de eliminación de E1 observadas fueron 67% en el filtro biológico y 83% en el proceso de lodos activados. Para E2 estas tasas fueron de 92 y 99,9%, respectivamente. Para el estrógeno anticonceptivo EE2 las tasas de remoción fueron de 64 y 78% para el filtro biológico y en el sistema de lodos activados. De acuerdo con Sole (2003) el estrógeno E2 es uno de los mayores responsables de la actividad estrogénica en los efluentes. EE2 se

elimina principalmente en forma de conjugados (Ying y col. 2002); además, también es un ejemplo claro de un compuesto hormonalmente activo (y muy potente) que, seguramente, puede tener algún impacto en el sistema endócrino de organismos receptivos no blanco, como los peces (Sumpter y Johnson 2006).

La presencia de estrógenos en el medio ambiente puede ser responsable de alteraciones fisiológicas e histológicas en animales, así como causar diversos impactos en la vida acuática (Johnson y Chen 2017). Entre los efectos causados se pueden citar feminización de peces machos; inducción al hermafroditismo; alteración en el funcionamiento de glándulas endócrinas de los animales; disminución de la fertilidad de mariscos, peces, aves y mamíferos; disminución de la supervivencia de la prole, así como la alteración del sistema inmunológico y comportamentales de aves y mamíferos; disminución del éxito de eclosión de huevos de peces, aves y reptiles (Brion y col. 2004).

Al analizar los valores obtenidos en ese estudio se observa que fueron mayores que los reportados en la literatura. Los estudios de Routledge col. (1998) indican que truchas arco iris del sexo masculino pasaron a producir vitelogenina (VTG) observándose respuestas entre 1 y 10 ng/l de E2 y entre 25 y 50 ng/l para E1 en el agua. Este descubrimiento ocurrió cuando los pescadores encontraron peces hermafroditas cercanos a PTAR, y luego fue confirmada por la utilización de truchas enjauladas, que sometidas a un ambiente con estradiol pasaron a sintetizar VTG, según datos reportados por Purdomy col. (1994).

Investigaciones realizadas por Thorpe (2003) demostraron que pequeñas concentraciones de estrógenos fueron suficientes para causar daños reproductivos en peces como la feminización del tubo reproductivo, hecho verificado en peces cebrá juveniles expuestos a 100 ng/l de E2 por un período de 21 días. En la revisión sobre feminización de peces realizada por Christiansen y col. (2002) se ha notificado que los estrógenos pueden inducir hemafroditismo en concentraciones de aproximadamente 0,1 ng/l de EE2 y 10 ng/l de E2, y una concentración de 5 ng/l de E2 puede inducir otros efectos adversos para salud de los peces.

Las PTARs como vienen siendo construidas en los últimos años no son apropiadas para la remoción de estrógenos, sino solamente materia orgánica y patógenos (Aquino y col. 2013). Esto sucede porque la problemática de la presencia de estos contaminantes es relativamente reciente y, por lo tanto, aún no se han desarrollado métodos que sean eficientes para la remoción de estos compuestos durante el proceso de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, actualmente han crecido los trabajos de investigación, y consecuentemente el conocimiento, acerca del destino y comportamiento de estrógenos en PTAR.

Conclusión

Los datos obtenidos de esta investigación en la cual se analizaron efluentes de PTARs demuestran que hubo eficiencia en los procesos de depuración, a pesar de no haberse eliminado totalmente los estrógenos. El hecho preocupante, en Brasil, es que los sistemas de recolección y tratamiento de aguas residuales se han implementado sólo parcialmente y por lo tanto, la probabilidad de que aparezcan compuestos emergentes de interés en las aguas es significativa. Junto a esto, tenemos un sistema de mo-

nitoreo precario en más del 50% de los municipios brasileños y el resto es inexistente, lo que impide una evaluación más precisa de la calidad de las aguas de los ríos, del abastecimiento de aguas y de las posibilidades de ingestión de estos contaminantes por parte de la población. De esta forma, este trabajo contribuye a enterarse de un tema aún poco estudiado, donde se han generado datos que permitieron conocer el tratamiento y la presencia de estrógenos en dos importantes PTAR, y alertar sobre el problema aquí expuesto. Por la importancia de las sustancias con potencial de generar disrupción endócrina es necesario continuar con estudios sobre metodologías de detección de estrógenos.

Bibliografía citada

Adeel M., Song X., Wang Y., Francis D., Yang Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ Int.* 2017;99:107-119.

Aerni H.R., Kobler B., Rutishauser B.V., Wettstein F.E., Fischer R., Giger W., Hungerbühler A., Marazuela M.D., Peter A., Schönenberger R., Vögeli A.C., Suter M.J.F., Eggen R.I.L. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(3):688-696.

Ahmed S.R. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicol.* 2000;150:191-206.

Aquino S.F., Brandt E.M.F., Chernicharo C.A.L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos Estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Eng Sanit Amb.* 2013;18:187-204.

Atkinson S.K., Marlatt V.L., Kimpe L.E., Lean D.R., Trudeau V.L., Blais J.M. The occurrence of steroidal estrogens in southeastern Ontario wastewater treatment plants. *Sci Total Environ.* 2012;430:119-25.

Bento A.P., Sezerino P.H., Philippi L.S., Reginato V., Lapolli F.R. Caracterização da microfauna em estação de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. *Eng. Sanit. Amb.* 2005;10(4):329-338.

Bila D.M., Dezotti M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química Nova. 2007;30(3):651-666.

Brasil. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, 2011.

Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J.M., Garric J., Flammarion P. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebra fish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicol. 2004;68(3):193-217.

Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., García-Jares C., Rodríguez I., Gómez M., Terres T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. Water Res. 2004.;38(12):2918-2926.

Cases V., Alonso V., Argandoña V., Rodriguez M., Prats D. Endocrine disrupting compounds: a comparison of removal between conventional activated sludge and membrane bioreactors. Desalination. 2011;272:240-245.

Castro C.M.B. Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. Eng Sanit Amb. 2002;7(1):4-5.

Eick G.N., Colucci J.K., Harms M.J., Ortlund E.A., Thornton J.W. Evolution of minima specificity and promiscuity in steroid hormone receptors. PLOS Genet. 2012;8:1-10.

Falcioni T., Manti A., Boi P., Canonico B., Balsamo M., Papa S. Enumeration of activated sludge bacteria in a wastewater treatment plant. J Biol Regulators and Homeostatic Agents. 2005;19(3-4):176-179.

Ferreira A.P., Cunha C.L.N, Roque O.C.C. Avaliação da microfauna no efluente final para monitoramento da qualidade ambiental em estações de tratamento de esgotos do tipo lodos ativados. Gaia Scientia. 2008;1(2):51-58.

Filby A.L., Neuparth T., Thorpe K.L., Owen R., Galloway T.S., Tyler C.R. Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. Environ Health Perspect. 2007;115(12):1704-1710.

Gagne F., Blaise C., Andre C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Ecotoxicol Environ Saf. 2006;64:329-336.

Gravato C., Santos M.A. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. Ecotoxicol Environ Saf. 2003;55:300-306.

Hashimoto T., Murakami T. Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments. Water Res. 2009;43:573-582.

Hoeger B., Hitzfeld B., Kollner B., Dietrich D.R., van den Heuvel M.R. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. Aquat Toxicol. 2005;73:79-90.

Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A. Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. Sci. Total Environ. 2000;256:163-173.

Johnson A.C., Chen Y. Does exposure to domestic wastewater effluent (including steroid estrogens) harm fish populations in the UK? Sci Total Environ. 2017;589:89-96.

Liney K.E., Hagger J.A., Tyler C.R., Depledge M.H., Galloway T.S. Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. Environ Health Perspect. 2006;114:81-89.

Mierzwa J.C., Aquino S.F.E., Veras L.R.V. Remoção de Desreguladores Endócrinos. In: Programa de Pesquisa em Saneamento Básico, Edital 5 (PROSAB 5). Remoção de microorganismos emergentes e micro contaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Valter Lucio de Pádua (coordenador). Rio de Janeiro: ABES; 2009.

Moraes N.V., Grando M.D., Valerio D.A.R., Oliveira D.P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. Rev Bras Toxicol. 2008;21(1):1-8.

Moura J.A. Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto - ETE e estações de tratamento de água - ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré). Tese (Doutoradoem Química/ Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista; 2009.

Muller M., Rabenoelina F., Balaguer P., Patureau D., Lemenach K., Budzinski H., Barceló D., Alda M.L., Kuster M., Delgenès J.P., Hernandez-Raquet G. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(8):1649-1658.

Nelson E.D., Do H., Lewis R.S., Carr S.A. Diurnal variability of pharmaceutical, personal care product, estrogen and alkylphenol concentrations in effluent from a tertiary wastewater treatment facility. *Environ Sci Technol.* 2011;45(4):1228-1234.

Purdom C., Hardiman P., Bye V., Eno N., Tyler C., Sumpter J., Routledge E.J. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecol.* 1994; 8:275-285.

Reis Filho R.W., Araújo J.C.D., Vieira E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Química Nova.* 2006;29(4):817-822.

Routledge E.J., Sheahan D.C., Brighty C.G., Waldock M.E., Sumpter J.P. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol.* 1998;32(11):1559-1565.

Saeed T., Al-Jandal N., Abusam A., Taqi H., Al-Khabbaz A., Zafar J. Sources and levels of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Kuwait's coastal areas. *Mar Pollut Bull.* 2017;pii: S0025-326X(17)30216-3.

Sim W.J., Lee J.W., Shin S.K., Song K.B., Oh J.E. Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants. *Chemosphere.* 2011;82(10):1448-1453.

Slabaugh M.R., Seager S.L. *Organic and Biochemistry for Today* (6th ed.). Pacific Grove: Brooks Cole; 2007.

Sole M., Raldua D., Barcelo D., Porte C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2003;56:373-380.

Souza J.B.G. Estudo da ocorrência de tetraciclina e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS). Tese (Doutoradoem Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V., Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ.* 1999;225(1-2):135-141.

Suárez S., Carballa M., Omil F., Lema J.M. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Rev. Environ Sci Biotechnol.* 2008;7:125-138.

Sumpter J.P., Johnson A.C. Response to comment on lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol.* 2006;40:1086-1087.

Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ.* 1999;225:81-90.

Tollefsen K.E., Harman C., Smith A., Thomas K.V. Estrogen receptor (ER) agonists and androgen receptor (AR) antagonists in effluents from Norwegian North Sea oil production platforms. *Marine Pollution Bull.* 2007;54:277-283.

Witorsch R.J., Thomas J.A. Personal care products and endocrine disruption: a critical review of the literature. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40:1-30.

Yasuda M.T., Sakakibara H., Shimoi K. Estrogen and stress-induced DNA damage in breast cancer and chemo prevention with dietary flavonoid. *Genes Environ.* 2017;39:10. doi: 10.1186/s41021-016-0071-7.

Ying G.G., Kookana R.S., Kumar A., Mortimer

M. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queen Island. *Sci Total Environ.* 2009;407:5147-5155.

Ying G.G., Kookana R.S., Ru Y.J. Occurrence and fate of hormones steroids in environment.

Environ Internat. 2002;28:545-551.

Zorita S., Mårtensson L., Mathiasson L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci Total Environ.* 2009;407:2760-2770.

**Evaluación de la toxicidad subcrónica de la variedad colombiana de
Smallanthus sonchifolius (Yacón) en ratas hembra
Subchronic toxicity evaluation of colombian variety of
Smallanthus sonchifolius (Yacón) in female rats**

Rodríguez Espinosa, Jhon D.; Torres Wilches, Miguel A.*

Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 No. 45-03 Bogotá – Colombia.

*matorresw@unal.edu.co

Recibido: 28 de mayo de 2017

Aceptado: 27 de diciembre de 2017

Resumen. *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) es una planta usada comúnmente por largos periodos de tiempo con el fin de ayudar en el control de la diabetes y otros desordenes metabólicos, por lo que con el propósito de evaluar la toxicidad subcrónica de la variedad colombiana de esta planta, fueron tratadas 30 ratas hembra de 8 semanas de edad divididas en 6 grupos. A cada uno de ellos se administró durante 28 días una de las siguientes dosis de infusión acuosa liofilizada (500, 250 y 125 mg/kg de peso), evaluando paralelamente grupos control (positivo y negativo) e incluyendo entre ellos grupos con y sin dieta hipercalórica.

Para el seguimiento del perfil metabólico de los animales, se tomaron muestras de sangre periódicamente durante el ensayo y se evaluaron los niveles séricos de: glucemia, triglicéridos, colesterol total y HDL. Además, también se realizó el control del peso, así como estudios comportamentales que incluyeron el Test de Irwin y el Test Hipocrático. Al final de estudio (28 días), se realizó el análisis anatomopatológico e histológico comparativo con el fin de detectar posibles daños tisulares. Como resultado pudo observarse que el liofilizado, si bien puede tener un efecto antihyperglucemiante, no modificó significativamente el perfil lipídico. Además, a pesar de que la administración se hizo durante 28 días, no se observaron cambios comportamentales que evidencien toxicidad, pero sí pudieron observarse cambios histológicos en el tejido cardiaco como hialinización, separación y redondeo de fibras.

Palabras clave: *Smallanthus sonchifolius*; Toxicidad subcrónica; Diabetes; Síndrome metabólico.

Abstract. *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) is a plant commonly used over long periods of time to help control diabetes and other metabolic disorders. To assess the sub-chronic toxicity of the Colombia variety of this plant, it was tested on 30 eight-week-old female rats, divided into six groups. For 28 days each group was administered with the following doses: three groups with lyophilized aqueous infusion (500 mg, 250 mg and 125 mg per kg of weight), two control groups (positive and negative) being assessed in parallel; this groups receiving hyper-caloric diet, and the last group was the general control or normal control.

To monitor the animals' metabolic profile, blood samples were taken from time to time during the test period, and the serum levels of glycemia, triglycerides, total cholesterol and HDL were measured. Weight tracking was also carried out, as well as behavioral studies, including the Irwin Test and the Hippocratic Test. At the end of the study (28 days), comparative anatomic-pathological and histological analyses were performed to detect possible tissue damage. The results showed that, although the lyophilized infusion could have an antihyperglycemic effect, it did not significantly change the lipid profile. Moreover, though the infusion was administered during 28 days, it was found that it did not lead to any behavioral changes indicating toxicity, but did produce in heart tissue histological changes such as hyalinization, separation and rounding of fibers.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius*; Subchronic toxicity; Diabetes; Metabolic syndrome.

Introducción

Es conocido que la industria farmacéutica ha desarrollado una amplia gama de medicamentos para el tratamiento de la diabetes mellitus (tipo I y II), entre los que la gran mayoría poseen principios activos de origen sintético. Sin embargo, en los últimos años no sólo en Colombia sino también a nivel mundial, los productos de origen natural, suple-

mentos dietarios y productos fitoterapéuticos han cobrado gran importancia como alternativas de tratamiento o bien tratamientos complementarios (Genta y col. 2010). Éste es el caso del yacón (*S. sonchifolius*), planta de la familia Asteraceae ampliamente consumida en la región andina de Sudamérica (Habib y col. 2011; Ornelas y col. 2013), para el tra-

tamiento de la constipación intestinal, inhibición de diarreas, como antimicrobiano de bacterias gram-positivas y gram negativas, osteoporosis, aterosclerosis, diabetes mellitus y como reductor del riesgo de cáncer de colon (Naranjo y Torres 2015).

Smallanthus sonchifolius (conocido popularmente como Yacón) es una de las plantas comúnmente usadas para ayudar al control de la diabetes (especialmente tipo II) y otros desórdenes metabólicos como dislipidemia. Se la usa en forma de preparación por infusión de hojas y/o rizomas, a la que se atribuye múltiples propiedades terapéuticas (Naranjo y Torres 2015).

De acuerdo con la caracterización fitoquímica del extracto de hojas y rizomas, posee altos niveles de inulina y fructooligosacáridos (40-70%) (Naranjo y Torres 2015), que son polisacáridos solubles en agua pertenecientes al grupo de los hidratos de carbono no digeribles llamados fructanos. Es por ello que el extracto es altamente efectivo como prebiótico (Shoaib y col. 2016), pues estos compuestos modulan la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de bacterias benéficas en lugar de otras especies consideradas patógenas. Además, se ha reportado que la fermentación bacteriana de la inulina en el intestino grueso se relaciona con el aumento de la absorción intestinal y la biodisponibilidad de electrolitos como calcio y magnesio, tanto en animales (rata y cerdo) como en humanos. Esto ocurre porque la fermentación favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH luminal y mejoran la solubilidad de algunos minerales (Rodrigues y col. 2009). Además, la inulina es utilizada como sustituto de grasa, azúcar y modificador de textura de alimentos funcionales, que mejoran la salud por sus efectos gástricos benéficos (Shoaib y col. 2016).

A pesar de estudios en diversas partes del continente sudamericano, en los que se evalúa la toxicidad aguda del extracto acuoso, usando 2, 5 y 10 veces la dosis antihiper glucemiante sin causar toxicidad evidente (Genta y col. 2010), en un trabajo previo a este (Naranjo y Torres 2015) se estudió la toxicidad aguda utilizando como modelo animal ratas hembra, mediante la administración del liofilizado de la infusión acuosa de *S. sonchifolius* de la variedad colombiana. Aunque se determinó que el liofilizado tiene una DL50 mayor a

2000 mg/kg de peso corporal, es indispensable la evaluación de su toxicidad subcrónica, considerando el uso continuo que se recomienda hacer de él, para alcanzar los efectos antes mencionados. Más aún cuando se ha reportado un posible daño renal asociado con el aumento de los niveles de glucemia o bien, atribuido a la acción propia de la planta después de administración oral prolongada de sus extractos (De Oliveira y col. 2011).

Dada la alta incidencia a nivel mundial de la diabetes mellitus en la actualidad, afectando a cerca de 171 millones de personas y con una proyección de 366 millones para el año 2030 (OPS/OMS Chile 2017) sumado a que el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo de gran importancia para su desarrollo y el de otras enfermedades crónicas como la enfermedad coronaria, el control y la disminución de la masa corporal contribuye a ralentizar (e incluso detener) la progresión de la diabetes. Teniendo en cuenta que esto es una herramienta eficaz para tratar y prevenir la diabetes se complementa con las intervenciones dietarias (Genta y col. 2009).

Por otra parte, los productos antidiabéticos de origen natural cada día son más utilizados en la medicina moderna, incluso son recomendados por entidades tan importantes como la Organización Mundial de la Salud (OMS 2013). Es por ello que, el uso de productos derivados de algunos órganos de *Smallanthus sonchifolius* ha tomado fuerza gracias a sus propiedades antidiabéticas (Ornelas y col. 2013). Además, el yacón se encuentra en el mercado europeo como alimento funcional prospectivo y como suplemento dietario, principalmente dirigido a personas mayores, personas diabéticas y mujeres posmenopáusicas (Sousa y col. 2015).

El rizoma es comúnmente consumido como fruto y las hojas son utilizadas para la preparación de infusiones y extractos acuosos. De esta manera, existen productos como té y jarabes para los cuales se recomienda una ingesta diaria de 0,14 g/kg de peso corporal sin efectos gastrointestinales indeseables, para producir una disminución significativa del índice de masa corporal y de la circunferencia de cintura (Genta y col. 2009).

En cuanto a la caracterización fitoquímica, se describe que el yacón almacena carbohidratos en forma de β -(2 \rightarrow 1)-fructooligosacáridos, los cuales se encuentran en numerosos tipos de plantas, pero no en concentraciones tan

altas como en las raíces y hojas del yacón. Estos fructooligosacáridos han demostrado ser efectivos para controlar la constipación y disminuir los niveles de lípidos y glucosa en sangre (Genta y col. 2009; Shoaib y col. 2016).

La composición orgánica de *S. sonchifolius* también incluye la presencia de lactonas sesquiterpénicas, de las cuales la más abundante y estudiada es la enhydrina, responsable no sólo de parte de la actividad hipoglucemiante sino también de potenciales daños renales (De Oliveira y col. 2011; Serra y col. 2012). Este compuesto se encuentra abundantemente en los tricomas de las hojas y se ha demostrado que es eficaz para reducir la glucosa post-prandial, siendo útil como alternativa en el tratamiento de la diabetes en animales, utilizando dosis mínima de 0,8 mg/kg de peso corporal (Genta y col. 2010).

Adicionalmente, el yacón contiene compuestos fenólicos como son ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico y ácido protocatéuico, responsables de una actividad antioxidante comparable incluso con la del ácido ascórbico. Dado que el estrés oxidativo es reconocido ampliamente como característica principal de algunas enfermedades crónicas, enfermedades neurodegenerativas y diabetes (Dionísio y col. 2015; Sousa y col. 2015), el uso de esta planta para el tratamiento de estas patologías resultaría útil.

De esta planta también se han evaluado extractos obtenidos con otros disolventes como metanol, butanol y cloroformo, demostrando actividad hipoglucemiante en dosis de 50, 10 y 20 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Con esto, un estudio en animales diabéticos demostró que la administración diaria de cada extracto durante 8 semanas, produjo un control eficaz de la glicemia gracias al aumento del nivel de insulina en plasma (Genta y col. 2010), esto a la luz de que, en otro experimento similar, ratas tratadas con la harina de la raíz de yacón mostraron un aumento de células pancreáticas generadoras de insulina. (Habib y col. 2011).

Un estudio toxicológico reportó que el hígado y los riñones son los principales órganos comprometidos en posibles daños tisulares, puesto que suelen estar involucrados en la eliminación de los compuestos fitoquímicos de la planta (De Oliveira y col. 2011). Además, no sólo se ha reportado daño renal con la administración crónica del extracto de la

planta, sino también un aumento en el nivel de albúmina relacionado con el proceso de deshidratación (debido a la actividad osmótica que posee), que puede estar relacionado con la función renal (De Oliveira y col. 2011). En contraposición, otros estudios no evidenciaron toxicidad ni disminución de niveles de glucemia (pero sí reducción de triacilglicéridos en suero), lo que contribuye reduciendo la cetogénesis (Genta y col. 2005) e incluso se sugiere que el consumo de extracto de yacón podría ser hepatoprotector (Ornelas y col. 2013).

Siendo así, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Evaluar la toxicidad subcrónica oral a 28 días de *Smallanthus sonchifolius*, como infusión acuosa de partes aéreas de la planta (hojas), en modelo roedor de rata.

Objetivos Específicos:

1. Determinar los efectos adversos a través alteraciones comportamental y de peso corporal, durante el periodo de exposición a la infusión de *Smallanthus sonchifolius*.
2. Realizar la determinación de los niveles clínicos de marcadores sanguíneos del metabolismo energético necesarios para establecer la valoración de los efectos.
3. Realizar el análisis anatomopatológico de la totalidad de los animales, estableciendo la correlación de las alteraciones entre los animales control y los de tratamiento con la infusión.
4. Establecer la evaluación histopatológica de los órganos que así lo requieran, de acuerdo con lo determinado mediante el análisis anatomopatológico.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado se recolectó en el municipio de Tenjo, Cundinamarca, ubicado en la provincia de Sabana centro a 37 Km de Bogotá, con una altitud de 2685 msnm.

Una vez recolectadas las hojas de la planta, se secaron en un horno a 45°C por 5 días. Posteriormente se trituró por molienda y se preparó una infusión utilizando 1,2 gramos de hoja seca por cada 100 mL de agua potable recién hervida a ebullición. Dicho extracto se llevó a un liofilizador por 48 horas. Finalmente, con el liofilizado obtenido, se preparó una solución al 20% en agua destilada para ser administrada

en los animales de acuerdo con su peso.

Animales de experimentación, dieta y condiciones de mantenimiento

El modelo animal utilizado fue la rata Wistar, tomando un grupo total de 30 ratas hembra de 8 semanas de edad, obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia. Los animales fueron obtenidos sanos y de forma aleatoria entre la población general, teniendo como criterio una variación de peso no superior al 20% entre ellos, alcanzando una varianza de peso homogénea entre los animales. Luego de esto, la distribución de los animales se hizo en 6 grupos de 5 animales cada uno, permitiendo un periodo de adaptación al bioterio del Departamento de Farmacia durante 2 semanas sin realizar con ellos procedimiento alguno, para lograr su aclimatación a las nuevas condiciones de humedad, luz y temperatura (condiciones ambientales promedio del bioterio: 65±10% HR, 18±7 °C, y 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Además, se les permitió el consumo de agua y alimento (LabDiet®) *ad libitum*. Después de dicho periodo de aclimatación, 5 de los 6 grupos de animales se alimentaron durante 2 semanas con dieta hipercalórica (alimento con un porcentaje mayor en grasa (20%) y agua edulcorada con 5% de panela comercial). El grupo restante fue alimentado con dieta normal y agua pura, el cual fue denominado como grupo control general, por ser expuesto exclusivamente a la administración del vehículo usado en la disolución del extracto liofilizado (agua purificada).

La administración del liofilizado de la infusión de la planta fue realizada diariamente a 3 de los 5 grupos alimentados con dieta hipercalórica, usando una de las siguientes dosis para cada uno de estos tres grupos: 125, 250 y 500 mg/kg de peso corporal. El cuarto grupo, alimentado con dieta hipercalórica, fue sometido diariamente a administración intraperitoneal de solución inyectable de Insulina Glargina (Lantus®) en dosis de 2 UI/kg, siendo considerado como control positivo. El quinto y último grupo alimentado con dieta hipercalórica, también fue administrado únicamente con el vehículo del liofilizado, siendo considerado el control negativo.

Durante el periodo de estudio (28 días), el grupo control general recibió la dieta que proporciona la cantidad de grasa recomendada como normal para la crianza de estos animales (aprox. 10%). Los grupos alimentados con dieta hipercalórica, recibieron alimento con aproximadamente 30% más de contenido de grasa, equivalente a la adición de aceite de coco y grasa vegetal en proporción 10:20:70 con el alimento LabDiet®, recibiendo adicionalmente agua edulcorada con agua panela. El peso de todos los animales usados en la experiencia fue controlado semanalmente.

Niveles de dosificación

Teniendo en cuenta resultados previos (Naranjo y Torres 2015), se definió la administración de dosis de 125, 250 y 500 mg/kg de peso corporal durante un periodo de 28 días (Tabla 1), a fin de evaluar la toxicidad subcrónica del liofilizado de la infusión acuosa de las hojas del yacón.

Tabla 1. Diseño experimental por caja de mantenimiento de los animales

	Grupo1	Grupo 2	Grupo3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Nº animales	5 ratas	5 ratas	5 ratas	5 ratas	5 ratas	5 ratas
Dosis	Vehículo	Vehículo	Insulina 2 UI	125 mg/kg	250 mg/kg	500 mg/kg

Período de observación

El periodo de observación de los animales tras su adaptación al bioterio y pretratamiento con dieta hipercalórica, correspondió a los 28 días durante los cuales se realizó administración peroral diaria del liofilizado. A través de todo el periodo de administración se realizaron periódicamente evaluaciones compor-

tamentales y el monitoreo de la variación de peso corporal, prestando atención a manifestaciones de posibles efectos adversos considerados signos de toxicidad.

Toma de muestras de sangre

Se realizó la toma de muestras sanguíneas de aproximadamente 200 µL de todos los

animales, a través de punción retro-orbital usando para ello capilares estériles con anti-coagulante (solución de EDTA al 3%). Posteriormente las muestras fueron depositadas en tubos *Eppendorf* y centrifugadas a 2500 rpm, separando seguidamente el plasma que fue mantenido bajo congelación a -4 °C hasta su correspondiente análisis.

Análisis de las muestras de plasma

Una vez descongeladas las muestras de plasma, se calentaron en baño maría hasta alcanzar una temperatura de 35-37 °C y se adicionaron los volúmenes de reactivos de acuerdo con los insertos de los Kits de la compañía Wiener Laboratorios, para la determinación de Colesterol total (Colestat enzimático AA) y HDL (HDL Colesterol FT), glucosa (Glicemia enzimática AA), y triglicéridos (TG Color GPO/PAP AA).

Para el análisis instrumental se utilizó un espectrofotómetro tipo Optizen POP/UV-Vis del Laboratorio de Análisis Instrumental - Departamento de Farmacia, trabajando a las longitudes de onda que se referencian en los insertos anteriormente mencionados.

Test de Irwin e Hipocrático

Se realizaron los procedimientos observacionales sistemáticos recomendados por la ICH (*The International Conference on Harmonisation*), cuyo objetivo fue observar cambios comportamentales producto de la administración de la sustancia de prueba. En este tipo de test se comparó el comportamiento de los animales pertenecientes al grupo control, con el presentado por los animales expuestos a la infusión (*Tabla 2*).

Examen macroscópico e histopatológico

Al finalizar el estudio en el día 28 de la administración, los animales fueron pesados y sacrificados por el método de dislocación cervical, para posteriormente evaluar posibles cambios patológicos macroscópicos. Se realizó una evaluación anatomopatológica comparativa entre animales control y aquellos tratados con liofilizado.

La evaluación histopatológica fue realizada para los principales órganos (riñón, hígado, corazón, bazo, pulmón, páncreas y cerebro) de los animales de experimentación, en el laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 2. Parámetros de evaluación comportamental

TEST DE IRWIN E HIPOCRÁTICO	
VARIABLE	PARÁMETRO A EVALUAR
SNC	Aumento Actividad motora
	Disminución Actividad motora
	Tremores
	Fasciculaciones
	Convulsiones
	Ataxia
	Locomoción inusual
	Somnolencia
	Analgesia
	Anestesia
	Parálisis patas
	Actividad prensil
	Reacción de alarma
	Perdida reflejo enderezamiento
	Perdida reflejo corneal
	Perdida reflejo pineal
	Salto
	Incoordinación motora
	Retorciones abdominales
	Esterotipias (inhalar, masticar)
	Sacudidas cabeza
Rascarse	
Ojos	Enoftalmo
	Nistagmus
	Lagrimación
	Miosis
	Midriasis
	Exoftalmos
	Ptoxis
	Cromodaciorrea
	Relajación membranas nictitantes
	Apariencia piel
Hiperemia	
Cianosis	
Efectos generales	Sialorrea
	Erección de la cola
	Piloerección
	Diarrea
	Priapismo
	Signo de Robichaud
	Disnea
Descarga nasal	
Efectos subjetivos	Temeroso
	Pasivo
	Agresivo

A todas las ratas se les hizo necropsia completa y se tomaron muestras de todos los tejidos, siendo fijadas en formol tamponado al 10% durante 48 horas.

Para el análisis histológico, los tejidos se incluyeron en parafina y se hicieron cortes de 5 µm que se procesaron por la técnica de rutina con hematoxilina eosina. Las láminas procesadas se observaron al microscopio de luz y se clasificaron las lesiones de los órganos se-

gún su gravedad, de la siguiente manera:

0= Sin presencia de lesión

1= Lesión leve

2= Lesión moderada

3= Lesión severa

Análisis estadístico

Los datos de las pruebas sanguíneas y de peso recibieron análisis estadístico a través del uso del programa IBM SPSS Statistics, versión 24,0 para Windows. Las variables estudiadas se describieron por grupos obteniendo la media y la desviación estándar. La homogeneidad de las varianzas se determinó por la prueba Levene ($p > 0,05$). Se implementó la prueba t Student para muestras independientes con objeto de determinar diferencias entre el peso antes de la administración de la infusión y la ganancia de peso a través de las pruebas.

Para analizar las diferencias en los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL se aplicó análisis de varianza (ANOVA); al resultar varianzas con diferencia estadísticamente significativa, se aplicó la prueba de Duncan. Todos los análisis se trabajaron con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Test Irwin e Hipocrático

Los resultados de las pruebas comportamentales de los animales bajo las diferentes condiciones de tratamiento aplicadas no mostraron alteración significativa frente al comportamiento de los animales del grupo control general. En la ejecución de estas pruebas y en las observaciones realizadas a lo largo del estudio, no se observaron cambios que evidenciaran alteración del SNC, o de algún otro parámetro fisiológico de los animales de experimentación (miosis o midriasis, piloerección, disforesis, epifora, poliurea, diarrea, etc.). Por esto se considera que bajo las condiciones de exposición al liofilizado ningún parámetro evidenció toxicidad.

De acuerdo con lo anterior, las observaciones realizadas sugieren que no hubo una alteración importante del sistema extrapiramidal, puesto que no se observó la miorelajación que generalmente puede estar asociada con disminución del tono muscular. Igualmente, no se observó una alteración de la sensibilidad general (en término de respuesta a estímulos evaluados), lo cual sugiere que

tampoco se manifestaron cambios en los núcleos talámicos o ganglios basales. Tampoco se evidenciaron cambios en los movimientos oculares, vigilia o sueño, lo que podría sugerir que tampoco se efectuó el sistema reticular activador. También se descartó una posible acción en la función vestibular de las ratas tratadas, puesto que no se observó la alteración de orientación, equilibrio o control espacial, evaluada en las pruebas de campo abierto.

Variación de peso corporal

El control del peso de los animales tratados se realizó semanalmente como parámetro de evaluación de la toxicidad ejercida por la infusión, frente a lo observado en los animales del grupo control. Además, considerando el efecto que la infusión podría ofrecer sobre la ganancia de peso con administración de dieta hipercalórica, se determinó que el tratamiento produjo un aumento de peso generalizado en la población de animales expuesta a estas condiciones, lo cual se atribuyó tanto al desarrollo normal de los animales (como en el caso de animales control), como a la administración de dieta hipercalórica. Se destaca el hecho de que no se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos a los que se administró dieta hipercalórica y adicionalmente el liofilizado, comparados con el grupo de animales a los que no se administró liofilizado, pero sí se expusieron a la dieta hipercalórica, indicado que no hubo efecto del liofilizado en la ganancia de peso.

Es importante resaltar, que sí hubo una diferencia significativa en el aumento de peso entre el grupo control positivo y el control general, lo cual indica que las diferencias entre estos dos grupos fue consecuencia de la administración de insulina al control positivo, ya que esta facilita el depósito adecuado de nutrientes llevando a un mayor aumento de peso. Esto demuestra, que el liofilizado administrado no ofrece un efecto similar a la insulina sobre la ganancia de peso, ya que considerando que la administración de la dieta hipercalórica podría llevar a desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina o a diabetes, resalta que la infusión no ayuda al control de la ganancia de peso bajo las condiciones de exposición utilizadas.

Respecto al seguimiento del peso y al respectivo análisis de varianza llevado a cabo, se observó un aumento de peso generaliza-

do pero mayor en aquellos animales tratados con dieta hipercalórica frente a los tratados con dieta normal, lo cual es de esperarse puesto que el metabolismo en los animales adultos favorece el desarrollo de nuevos tejidos, pero debido a la administración de dieta hipercalórica podría ser fundamentalmente tejido graso (Figura 1). Sin embargo, en términos del aumento de peso se observa una sutil tendencia entre los animales a los que se les administró el liofilizado y la insulina intraperitoneal, puesto que estos últimos aumentaron de peso con una tasa de cambio ligeramente mayor. La insulina es una hormona que promueve la síntesis de proteínas y es considerada un factor de crecimiento, lo cual explica lo anterior. En cuanto a los animales que fueron tratados con el liofilizado del extracto, no se observaron cambios de peso abruptos o no esperados, lo cual sugiere que posiblemente el liofilizado de *S. sonchifolius* no haya alcanzado el efecto metabólico significativo durante el periodo de estudio.

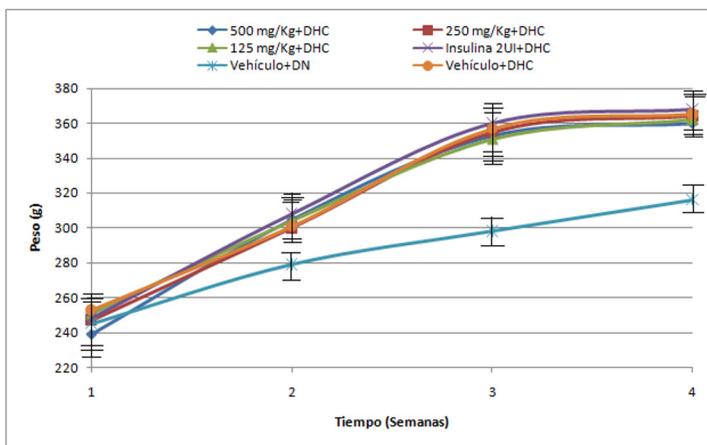


Figura 1. Variación de peso de todos los grupos de animales a lo largo del periodo de estudio.

En las observaciones macroscópicas realizadas mediante la necropsia, no se encontraron diferencias visiblemente relevantes en los principales órganos de los animales control frente a los de los diferentes grupos de tratamiento, lo cual también sugiere que la administración del liofilizado en las dosis señaladas en el presente estudio, no generarían alteraciones anatomopatológicas detectables o relevantes.

De manera general, en el análisis histopatológico se observó que el liofilizado administra-

do bajo un régimen subcrónico por 28 días, podría inducir cambios en el tejido cardíaco en términos de hialinización, separación y redondeo de fibras (Figura 2), de acuerdo con los análisis reportados por el laboratorio de patología. Estos cambios en el tejido cardíaco se observaron con mayor prevalencia en aquellos animales a los que se les administró la dosis más alta del liofilizado (Tabla 3), lo cual sugiere que podría estar relacionado con la exposición al mismo. Esto puede considerarse una evidencia de desarrollo de toxicidad, producto de la exposición al liofilizado bajo las condiciones de experimentación establecidas.

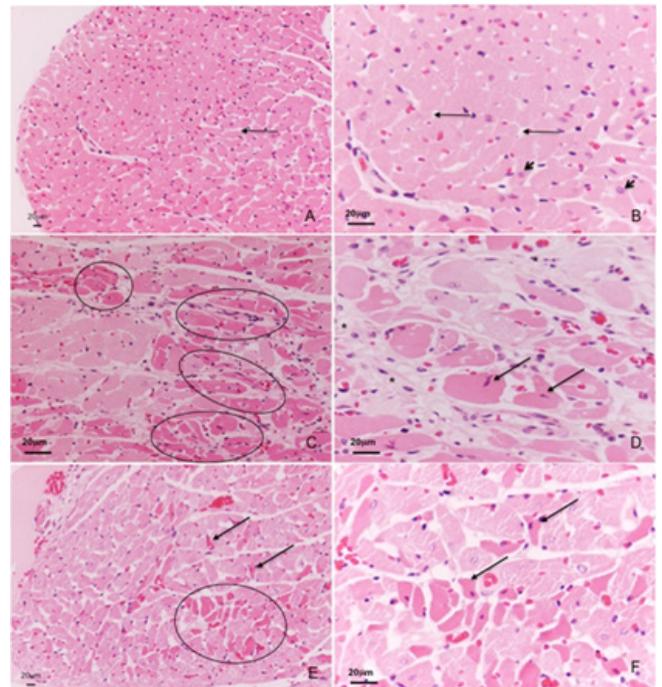


Figura 2. Microfotografías de lesiones cardíacas. A-B) Corazón sin lesión de un animal del grupo 6. A) Puede verse la separación normal entre fibras (flechas). B) Detalle de A, se observa el espacio normal entre fibras (flechas largas) y los núcleos de los cardiomiocitos sin lesión (flechas cortas). C y D) Muestra lesión severa de fibras en un animal del grupo 1. C) Es evidente la severa hialinización de fibras a manera de parches (demarcado con óvalos). D) Detalle de C donde se evidencia la hialinización de fibras y los cambios de forma de los núcleos (flechas). Además, se evidencia aumento del espacio entre las fibras y la presencia de células (asteriscos). E-F) Lesión moderada miocárdica de animal del grupo 9. E) Foco de degeneración demarcado en óvalo, flechas muestran espacio normal entre fibras. F) Detalle de la anterior donde se muestra la hialinización de fibras y cambios nucleares (flechas).

Tabla 3. Lesiones histopatológicas en corazón

			Congestión	Desorden de fibras	Hialinización de fibras	Separación de fibras	Redondeamiento de fibras	Núcleos irregulares	Celularidad entre fibras	Necrosis de fibras
1	500 mg	Dieta hipercalórica	1	2	3	3	3	2	2	1
2	500 mg	Dieta hipercalórica	1	0	1	1	1	1	0	0
3	500 mg	Dieta hipercalórica	2	1	1	1	1	0	0	0
4	250 mg	Dieta hipercalórica	1	0	2	1	1	1	0	0
5	250 mg	Dieta hipercalórica	2	1	2	2	2	1	0	0
6	250 mg	Dieta hipercalórica	1	1	0	1	1	0	0	0
7	150 mg	Dieta hipercalórica	3	1	1	1	1	1	0	0
8	150 mg	Dieta hipercalórica	2	1	1	1	0	1	0	0
9	150 mg	Dieta hipercalórica	1	1	2	2	2	2	0	1
10	Insulina	Dieta hipercalórica	0,5		0,5	0,5	0,5	0	0,5	0
11	Insulina	Dieta hipercalórica	2	1	2	1	1	1	0	0
12	Insulina	Dieta hipercalórica	2	1	1	1	1	1	0	0
13	Vehículo	Dieta normal	1	1	1	1	1	1	0	0
14	Vehículo	Dieta normal	2	1	1	1	1	1	0	0
15	Vehículo	Dieta normal	2	1	1	1	1	1	0	0
16	Vehículo	Dieta hipercalórica	2	1	2	1	2	2	0	0
17	Vehículo	Dieta hipercalórica	2	0	1	0	0	1	0	0
18	Vehículo	Dieta hipercalórica	2	0	1	0	0	1	0	0

Se sugiere que el mecanismo por el que ocurre el daño cardíaco descrito, podría estar relacionado con el daño tisular que generan las lactonas sesquiterpénicas (enhydrin), presentes en los tricomas de las hojas de *S. sonchifolius*. Estudios recientes de estos compuestos han reportado una importante actividad antiinflamatoria y se describe la insuficiencia cardíaca como uno de los efectos tóxicos de esta clase de agentes (De Oliveira y col. 2011; Habermehl y Fliegner 1998). Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado ningún reporte referente a este tipo de daño, por lo cual se sugiere realizar un estudio toxicológico

profundo en el que se evalúe la seguridad de las lactonas sesquiterpénicas obtenidas de las hojas de *S. sonchifolius*.

En el análisis de las muestras de plasma tomadas semanalmente de acuerdo con el respectivo tratamiento estadístico aplicado, se observó que comparando los animales tratados con las mayores dosis del liofilizado y aquellos con la misma dieta, pero sin administración del mismo, en la mayoría de los individuos se presentó un efecto hipoglucemiante producto del extracto liofilizado. Se trata de un ligero efecto, equivalente a una reducción del 6% frente a los animales del grupo con-

tol general, pero reportado en otros estudios como efecto evidente (De Oliveira y col. 2011; Naranjo y Torres 2015). Lo anterior sugiere que posiblemente la variedad colombiana de *Smallanthus sonchifolius* contiene niveles menores de los compuestos responsables de dicha actividad (enhydrin, ácido clorogénico e inulina) o bien que las dosis utilizadas no fuesen lo suficientemente altas, por lo cual también podría explicar que no se haya producido toxicidad renal bajo las condiciones de exposición al liofilizado utilizadas en esta investigación, como ha sido ya reportado para este tipo de metabolitos (De Oliveira y col. 2011; Serra y col. 2012).

Con lo anterior, también es importante considerar que los efectos benéficos del yacón se deberían a su gran contenido de fructooligosacáridos (inulina), presentes fundamentalmente en el rizoma (Genta y col. 2009). Resaltamos esto, por cuanto en el presente estudio lo evaluado fue el liofilizado de la infusión de hojas, las cuales tienen menor porcentaje de inulina como se describe en los textos consultados, lo cual podría justificar la baja actividad como hipoglicemiante y modulador del perfil lipídico, puesto que de acuerdo con los niveles de colesterol, HDL, triglicéridos encontrados en los animales del grupo control general, y los presentados por los animales expuestos al liofilizado bajo las diferentes dosis, no se observan tampoco diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, de acuerdo con los resultados presentados y habiendo aplicado el protocolo de tratamiento de la OECD para la evaluación de la toxicidad subcrónica de corto término, se recomienda realizar el estudio de toxicidad subcrónica más extenso (90 días) o toxicidad crónica, implementando un tiempo mayor de administración de dieta hipercalórica.

Conclusiones

1. No se encontraron cambios comportamentales que evidencien toxicidad del liofilizado de la infusión acuosa de *S. sonchifolius*, bajo las condiciones de experimentación señaladas.
2. La administración del liofilizado bajo las condiciones establecidas, no indujo cambios anatomopatológicos de acuerdo con el reporte entregado por el laboratorio de patología.
3. Como principal efecto adverso, la evaluación histopatológica permitió determinar daño del tejido cardíaco en términos de hialinización, separación y redondeo de fibras en ani-

males tratados con dosis del liofilizado de *S. sonchifolius* de 250 y 500 mg/Kg.

4. El liofilizado de la infusión de *S. sonchifolius* presentó leve efecto reductor de los niveles de glucemia, equivalente al 6% bajo las condiciones descritas, considerando valor normal promedio de 90 mg/dL en ratas bajo dieta normal (Habib y col. 2011).

5. El liofilizado no contribuyó significativamente al control del perfil lipídico de los individuos a los que les fue administrado, en comparación con el grupo control de referencia (negativo).

Agradecimientos: A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia por la contribución en la disponibilidad de laboratorios en los que se realizó el trabajo. A Silvia Mercedes Días Castro por su gran colaboración en la fase experimental del proyecto. A la profesora Lucía Botero, patóloga del Departamento de Medicina Veterinaria por su asesoría en la realización de los estudios histopatológicos.

Bibliografía citada

De Oliveira R., Aparecida D., Alves B., Franco J., Gobbom L., Akira S., Ferreira W., Batista F. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *J Ethnopharmacol.* 2011;133:434–441.

Dionísio A., De Carvalho L., Menezes N., De Souza T., Wurlitzer N., De Fatima M., Sousa E. Cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) functional beverage improve the diabetic state in rats. *Food Res Int.* 2015; 77:171–176.

Genta S., Cabrera W., Grau A., Sánchez S. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food Chem Toxicol.* 2005;43:1657–1665.

Genta S., Cabrera W., Habib N., Pons J., Manrique I., Grau A., Sánchez S. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clin. Nutr.* 2009; 28:182–187.

Genta S., Cabrera W., Mercado M., Grau A., Catalán C., Sánchez S. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions. *Chem Biol Interact.* 2010;185:143–152.

Habermehl G.G., Fliegner W. Terpenes and their Biological Relevance. *Studies in Natural Products Chemistry.* 1998; 20: 3-24.

Habib N., Honoré M., Genta S., Sánchez S. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacón) roots on diabetic rats: Biochemical approach. Chem Biol Interact. 2011;194:31–39.

Naranjo A., Torres M.A. Evaluación de la toxicidad aguda de la especie colombiana de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) en rata. Trabajo de grado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Junio 2015.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 2013.

Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) Chile. [en línea]. Diabetes. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional para las Américas. Santiago de Chile, 2017. [consulta: 27 de octubre 2017] Disponible en: http://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=178:diabetes&Itemid=1005.

Ornelas G., Pereira C., Henrique A. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl)] treatment. Food Chem Toxicol. 2013;59:256–260.

Rodrigues A., Mancini J., Parisi E., Cocato M., Coli C. Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats. Nutrition. 2009;25:216–225.

Serra C., Cabrera W., Honoré S., Mercabo M., Sánchez S., Genta S. Safety assessment of aqueous extract from leaf *Smallanthus sonchifolius* and its main active lactone, enhydrin. J Ethnopharmacol. 2012;144:362–370.

Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Rizwan H., Shakeel A., Ansari A., Niazi S. Inulin: Properties, health benefits and food applications. Carbohydr Polym. 2016;147:444–454.

Sousa S., Pinto J., Rodriguez C., Giao M., Pereria C., Tavaría F., Malcata F., Gomes A., Pacheco B., Pintado M. Antioxidant properties of sterilized yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour. Food Chem 2015;188:504–509.

RESUMEN DE TESIS

Lombrices de tierra como biomarcadores de efecto y exposición a xenobióticos metálicos (plomo y cadmio) en los diques Cruz de Piedra y La Florida

Curvale, Daniela Alejandra

Universidad Nacional de San Luis. Departamento de Farmacia, Área de Farmacología y Toxicología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia (FQByF). Chacabuco 917, D5700HOI San Luis, Argentina
curvale.daniela@gmail.com

Esta tesis postula y demuestra que: “existe correlación entre la concentración de metales pesados en el suelo, en el agua y en las lombrices de tierra, que permite evaluar la biodisponibilidad de los metales y la contaminación de los suelos”. Se aceptó el desafío enunciado por Kuperman que marcó la necesidad de salir del laboratorio, y trasladar los estudios al hábitat natural, en este caso, de las lombrices y comprobar si existe contaminación o no, por metales pesados en el suelo, a través del estudio del cuerpo de las lombrices.

Se demostró que existe una clara diferencia entre: la definición de biodisponibilidad utilizada por biólogos y ecotoxicólogos para estudios de contaminación y de riesgo, y la definición que utilizan los químicos, quienes mediante diferentes metodologías de análisis químicos, miden lo que ellos llaman disponibilidad química. La dicotomía que existe entre metales disponibles y biodisponibles, se debe a la interpretación que hacen los químicos respecto de la que utilizan los ecotoxicólogos. Los químicos, definen y miden la “biodisponibilidad” como la fracción extraída por una variedad de extractantes, por ejemplo EDTA. Mientras que, los ecotoxicólogos, buscan una forma de cuantificar la proporción realmente asimilada (biodisponibilidad) o, la concentración que tiene impacto tóxico sobre la biota (riesgo). Biodisponibilidad es el grado de libertad en que se encuentra un elemento o compuesto de una fuente potencial para ser capturado por un organismo (ingerido y/o absorbido). La problemática siempre fue como medirla, Sauv  propuso un enfoque basado en el modelo de actividad y supone que la biodisponibilidad de los metales está controlada por la actividad tamponada de los iones libres en solución, y no por la concentración total del metal. Logra mediante estudios estadísticos generar ecuaciones útiles para calcular la “ac-

tividad” de los mismos, valor que es equivalente a la biodisponibilidad.

Con la finalidad de evidenciar estos postulados, y atendiendo a que los cálculos de Sauv  cubren el rango de pH 3,5 a 8,5; y que los suelos estudiados est n dentro de ese rango, se calcularon las actividades de plomo y cadmio, y se comprobaron los postulados de Sauv , se demostró la contaminación de los suelos y se utilizaron las lombrices como bioindicadoras. Se generó un aporte al monitoreo ambiental, y al estudio de la oligoquetofauna. Además es el primer estudio sobre la contaminación de suelos en un ambiente muy sensible de la provincia de San Luis, por cuanto que ambos diques, La Florida y Cruz de Piedra; son reservorios de agua dulce, que se utilizan como provisión de agua potable para el 70% de la población.

En el catálogo de lombrices de tierra (*Annelida*, *Oligochaeta*) de la República Argentina (de Mischis, Catalina C.), se informan 9 especies para la provincia, en el presente trabajo se capturaron 8 de esas especies, más otras 3 especies que no est n citadas, siendo un total de 12 especies las que deberían figurar en el catálogo. Los Diques Cruz de Piedra y La Florida, son dos ambientes perturbados antropogénicamente, y las especies de lombrices exóticas capturadas han primado sobre las nativas. La relación encontrada entre nativas y exóticas fue de 0,12, índice invertido con respecto al total de Argentina (1,72). Esto se interpreta como una pérdida de diversidad, pero no se puede asegurar porque no hay estudios de base.

Del estudio de los Diques Cruz de Piedra y La Florida se demostró que la carga total de plomo y cadmio en los suelos de ambos, fueron estadisticamente semejantes (Pb Total 183,95 - 203,74 ppm; p-valor = 0,296 y Cd Total 22,058 - 20,078 ppm; p-valor = 0,568 respectivamente). Las [Pb (II)] y [Cd (II)] extraídas con

EDTA fueron estadísticamente diferentes p-valor $< 0,0001$ (21,082 - 66,566 ppm; y 1,604 - 6,668 ppm, respectivamente). El Dique Cruz de Piedra presenta un suelo débilmente alcalino a alcalino (pH: 7,62 -8,46) y el Dique La Florida tiene valores considerados neutros para los suelos (pH: 7,16-7,34) y esto explica la disminución de los metales extraíbles del Cruz de Piedra. De acuerdo a EPA, el área de estudio posee un alto nivel de contaminación por estos metales (164,72 y 245,87 ppm de Pb; y entre 12,09 y 31,12 ppm de Cd) y sería un problema potencial para los organismos que viven en ese ecosistema. El agua de ambos diques presentó niveles que superan los valores normados por la Ley de Aguas; a continuación se presentan las concentraciones medias y entre paréntesis sus correspondientes intervalos de concentración mínima y máxima. Para el Dique Cruz de Piedra [Pb] = 54,95 ppb (27,00 - 75,12 ppb) y [Cd] = 1,12 ppb (0,94 - 1,31 ppb); Dique La Florida [Pb] = 63,96 ppb (24,25 - 123,12 ppb) y [Cd] = 0,70 ppb (0,30 - 1,38 ppb). La concentración media de Pb y Cd de todos los oligoquetos capturados en el Cruz de Piedra fue [Pb (II)] = 44,56 ppm (13,78- 126,34 ppm); [Cd(II)] = 11,64 ppm (1,92 - 30,38 ppm); y en La Florida fue [Pb(II)] = 24,07 ppm (4,32- 74,00 ppm); [Cd(II)] = 3,22 ppm (0,03-34,47 ppm). Existen diferencias significativas entre los contenidos de los metales en las lombrices de ambos diques. Cruz de Piedra presenta una contaminación más elevada que se correlaciona perfectamente con las concentraciones de metales totales en suelo. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los contenidos de plomo y cadmio, entre las

diferentes especies de lombrices de ambos diques. Es decir, todas las especies capturadas poseen la capacidad de acumular metales pesados, porque los valores de las concentraciones de los metales pertenecen a la misma población. Para realizar la evaluación de las especies como bioindicadores, se calcularon los factores de acumulación suelo-biota (BSAF) de las especies de mayor abundancia, *Aporrectodea turgida* especie exótica más abundante del área y considerada como bioindicador, para los metales bajo estudio, se cumple que $BSAF_{Cd} = 0,756 > BSAF_{Pb} 0,477$, consistentes con los reportados bibliográficamente. *Eukerria saltensis* es la especie nativa más abundante, no ha sido nunca utilizada como bioindicador, el $BSAF_{Cd} = 1,105 (0,324 - 4,009) > BSAF_{Pb} 0,447 (0,314 - 0,977)$; estos son más elevados que los reportados y calculados para *A. turgida*. Los BSAF Pb son similares para ambas especies. *Eukerria saltensis* es un buen bioindicador para ambos metales, tanto en suelo como en agua, por su rango hidrófila-epianécica, por su excelente correlación con las concentraciones de metales en suelo y en agua, por que absorbe cadmio por su tegumento y por vía digestiva, y absorbe plomo por vía digestiva. Todas las especies estudiadas sirven como bioindicadores para monitoreo y control de la contaminación de suelos, aunque es necesario realizar estudios de carga base y registros de zonas contaminadas.

Tesis para acceder al título de Doctora en Química. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

Directora: Dra. Rosa Isabel Antón.

Co-Directora: Dra. Ana María Brigada.

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 Infor-

mación Científica y Tecnológica (CAICYT). En la página web del PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> se encuentran las instrucciones para los autores.

Gratuidad de las publicaciones

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

Derechos de autor

Acta Toxicológica Argentina es una publicación de acceso abierto y posee una Licencia Pública de Creative Commons (CC-BY-NC). Los autores conservan los derechos de autor y garantizan a la revista el derecho de ser la primera publicación del trabajo. Los autores retienen el derecho sobre sus trabajos bajo las normas de la licencia CC de tipo BY-NC, [HYPERLINK "http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/"](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/"](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 longi-

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplos:

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

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

Las referencias bibliográficas completas se incluirán al final del manuscrito bajo el título de Bibliografía Citada, en orden alfabético, con el

nombre de todos los autores en cada caso.

Ejemplos:

1. **Artículo estándar en publicación periódica**

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

2. **Libros y monografías**

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

3. **Capítulo de libro**

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

4. **Material electrónico**

a. Artículo en publicación periódica en internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [en línea]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.].

Disponible en: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>

B. Página en internet

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

c. Parte de una página de internet

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

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

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Such images should be not necessarily 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 submission and in English, each followed by four key words in the corresponding language. If the article is written in English, then the abstract in Spanish must be provided. Keywords must be headed by capital letters and separated by semicolons.

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

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

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

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

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

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

Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals and presented in separate pages. Drawings must be of good enough quality to ensure adequate reproduction. Bar, pie or statistical charts must be prepared in

GIF format. Numbers, letters and signs within figures must be of the appropriate size to be legible when the final sizing takes place. All signs used must have a reference in the figure caption.

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements. Limit to a single paragraph, using Arial 10 lettering.

References. Citations in the text consist of the authors' last name (up to two authors) and the year of publication in parentheses. In the case of more than one citation, list them from the

oldest to the newest and separate citations by semicolons. For more than two authors, only cite the first author's last name followed by *et al.* and the year of publication.

Examples:

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

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

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

Examples:

1. **Standard article in periodical publications**

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

2. **Books and monographs**

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

3. **Book chapters**

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

4. **Electronic material**

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

B. Website

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

c. Partial website

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

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

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As imagens não devem ser excepcionais, mas sim ilustrativas.

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

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

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

Não deve haver mais de três (3) autores.

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

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

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

Envio de trabalhos

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

Custos de publicação gratuitos

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

Direitos autorais

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

Os direitos de publicação

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

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

espécie em itálico.

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

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

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

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

Exemplos:

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

“Em um consenso geral, seria desejável que a ingestão total de cafeína durante a gravidez supere 300 mg/dia (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser 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 tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw- Hill; 2002. p. 93-113.

4. Material eletrônico

a. Artigo em publicação periódica em internet

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

b. Página de internet

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

c. Parte de uma página de internet

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

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