

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 27
N° 1
Mayo 2019

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

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

Se encuentra indexada en los siguientes directorios:

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



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión directiva

Presidente

Mirtha M. Nassetta

Vicepresidente

Ricardo A. Fernández

Tesorera

Mirta Ryczel

Secretaria

Julietta S. Borello

Vocales

Fernanda Simoniello

Jorge Zavatti

Patricia Lucero

Vocales suplentes

Ana Irene Cañas

Augusto Piazza

Noemí Reartes

Comité científico

Aldo Sergio Saracco

Silvia Cristina Cortese

María Graciela Bovi Mitre

Gerardo Daniel Castro

Adriana Silvia Ridolfi

Órgano de fiscalización

Daniel González

Patricia Quiroga

Adriana Piñeiro

Tribunal de honor

José A. Castro

Edda C. Villaamil Lepori

Elda Cargnel

Acta Toxicológica Argentina

Director

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

Comité de redacción

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

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

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

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

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

Comité de apoyo

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

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

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

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

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

Comité editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

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

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

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

Heraldo N. Donnenwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

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

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

Veniero Gambaro, *Università di Milano, Italia*

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

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

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

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

Haydée N. Pizarro, *CONICET, Argentina*

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

María M. Salseduc, *Laboratorios Bagó, Argentina*

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

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

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

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

Eugenio Vilanova Gisbert, *Universidad Miguel Hernández, España*

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

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

INDICE
(CONTENTS)

Artículos originales

| | |
|--|----|
| Uso inapropiado de diuréticos. Algunas características no tan conocidas <i>Astolfo, María Agustina; Olivera, Nancy Mónica; Pongelli, Valeria; Fernández, Nicolás; Olmos, Valentina</i> | 5 |
| Concentración de aluminio en carne cocida almacenada en bandejas de aluminio descartables <i>Iezzi, Sebastián; Lifschitz, Adrian; Landa, Roberto; Quiroga, Miguel Angel; Purslow, Peter P.</i> | 13 |
| Evaluación de riesgo a la salud y contaminantes en agua de bebida. Importancia de la ingesta de agua <i>Othax, Natalia; Peluso, Fabio; González Castelain, José; Masson, Ignacio; Dubny, Sabrina</i> | 19 |
| Comparative study with dry crude extracts of <i>Ananas comosus</i> L. Merrill using LC50 and erythrocyte osmotic fragility as toxicity parameters <i>Paixão, Yasmim Dayane Leal; Bernardo de Oliveira, Vanessa Camylla; Tabosa, Maria Gabrielle de Oliveira; Gomes da Silva, Jamicelly Rayanna; Pereira Cordeiro, Risonildo; de Melo, Arquimedes Fernandes Monteiro</i> | 30 |
| Instrucciones para los autores | 37 |

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

Uso inapropiado de diuréticos. Algunas características no tan conocidas Diuretic misuse. Some not so well known characteristics

Astolfo, María Agustina; Olivera, Nancy Mónica; Pongelli, Valeria; Fernández, Nicolás; Olmos, Valentina*

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Toxicología y Química Legal. Laboratorio de Aseoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA). Junín 956, 7° piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1113AAD), Argentina. Tel: +5411 5287 4751.

*volmos@ffyb.uba.ar

Recibido: 22 de octubre de 2018

Aceptado: 26 de noviembre de 2018

Resumen. Entre las situaciones asociadas al uso inapropiado de diuréticos se encuentran los intentos por descender rápidamente de peso, comunes en los desordenes de la alimentación, y los intentos por enmascarar el consumo de otras sustancias, en el caso de las competencias deportivas. El uso sin indicación ni supervisión médica de estos fármacos genera un desbalance electrolítico, que puede manifestarse con hiponatremia, hipocalemia, hipocalcemia e hipomagnesemia, hipercalemia, entre otras alteraciones. El objetivo de este trabajo fue investigar las características del uso inapropiado de diuréticos a partir de la casuística del CENATOXA. Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo sobre los análisis ingresados al CENATOXA con solicitud de investigación cualitativa de diuréticos en orina, entre los años 2002 y 2016. En dicho período ingresaron al CENATOXA 138 casos, de los cuales el 56 % resultó positivo para algún diurético. Del total de casos con resultado positivo, el 93,5 % fueron mujeres entre 25 y 55 años de edad y predominó la etiología intencional. Los diuréticos mayoritariamente encontrados fueron hidroclorotiazida y furosemida. El perfil de diuréticos hasta el año 2008 (hidroclorotiazida = 68% de los casos positivos) se diferenció del hallado entre 2009 y 2016 (furosemida + hidroclorotiazida = 60% de los casos positivos). Se observó recurrencia en el uso inapropiado en el 8% de los casos. El uso simultáneo de más de un diurético y la recurrencia son factores que pueden contribuir a la aparición de toxicidad. Estos resultados sugieren que el uso inapropiado de diuréticos es una situación que debería ser observada más atentamente para establecer mejor su alcance y sus riesgos.

Palabras claves: Diuréticos; Uso inapropiado; Furosemida; Hidroclorotiazida

Abstract. Among the situations associated with diuretics misuse are the attempts to lose weight fast, frequently observed in eating disorders, and the attempts to mask the consumption of other substances, in the case of sports competitions. The use of these drugs with no medical indication or supervision generates an electrolyte imbalance, leading to hyponatremia, hypokalemia, hypocalcemia and hypomagnesemia, hyperkalemia, among other alterations. The objective of this work was to investigate the characteristics of diuretics misuse from the CENATOXA database, where the qualitative investigation of diuretics in urine is performed. A descriptive retrospective study was conducted on the cases admitted to the CENATOXA with a request for qualitative diuretic investigation, between 2002 and 2016. During this period, 138 urine samples were received at the CENATOXA and 56% were positive for at least one diuretic. Of all cases with positive results, 93.5% were women between 25 and 55 years of age, and intentional etiology predominated. The most detected diuretics were hydrochlorothiazide and furosemide. The diuretic misuse pattern detected up to 2008 (hydrochlorothiazide = 68% of positive cases) differed from that detected between 2009 and 2016 (furosemide + hydrochlorothiazide = 60% of positive cases). Recurrence in misuse was observed in 8% of the cases. The simultaneous misuse of more than one diuretic and the recurrence are factors that can contribute to the onset of toxicity. These results suggest that diuretic misuse is a situation that should be observed more closely to better assess its consequences and its risks.

Keywords: Diuretics; Misuse; Furosemide; Hydrochlorothiazide

Introducción

Los diuréticos constituyen un grupo indispensable de medicamentos que se emplean para ajustar el volumen o la composición de los líquidos corporales en diversas situaciones clínicas, entre ellas hipertensión, insuficiencia

cardíaca aguda y crónica, insuficiencia renal aguda y crónica, así como síndrome nefrótico y cirrosis (Jackson 2006; Kumra y Bargman 2014; Oh y Han 2015; Roush y Sica 2016). El uso inapropiado (o abuso) se presenta cuando no

existe indicación ni prescripción médica para su utilización. Entre las situaciones asociadas al uso inapropiado se encuentran los intentos por descender rápidamente de peso, comunes en los desordenes de la alimentación (anorexia nerviosa o bulimia) (Díaz Marsá y col. 2017; Nagata y col. 2018), y los intentos por enmascarar el consumo de otras sustancias, por ejemplo dilución de la orina en el caso de las competencias deportivas (Cadwallader y col. 2010; Mayr y col. 2012; O'Malley 2015). Todos los tipos de diuréticos están prohibidos por la Agencia Mundial de Dopaje (WADA 2018).

El uso sin indicación ni supervisión médica de estos fármacos genera un desequilibrio electrolítico, que puede manifestarse con hiponatremia (especialmente con tiazidas), hipocalcemia, hipocalcemia e hipomagnesemia (diuréticos de asa y/o tiazidas), hipercalemia (ahorradores de potasio), entre otras alteraciones (Wile 2012).

Los diuréticos con vida media corta como la furosemida y la hidroclorotiazida son los de elección tanto en el caso de deportistas como en personas con desordenes alimentarios (Brenner y col. 2011, Mayr y col. 2012, Angulo Sánchez y López Álvarez 2014, Pal y Sachdeva 2016) lo cual los lleva a ser los más reportados en los casos de abuso (Gerstein y Woodside 1997; Cadwallader y col. 2010; O'Malley 2015).

En el Laboratorio de Asesoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA), que funciona en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, se realiza la investigación cualitativa de diuréticos en orina. El objetivo de este trabajo fue investigar las características del uso inapropiado de diuréticos a partir de la casuística del CENATOXA.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo sobre 138 casos ingresados al CENATOXA con solicitud de investigación cualitativa de diuréticos, durante el período comprendido entre los años 2002 y 2016.

Las características consideradas en el aspecto descriptivo fueron: el resultado del análisis (positivo o negativo), el diurético involucrado, la edad y el género del paciente, la etiología, la presencia de hipocalcemia (definida como al menos un valor de potasio plasmático menor de 3,5 mEq/l (Chemocare 2018) y la recurrencia (definida como la repetición de la situación que determina la solicitud del análisis). Para analizar la edad se consideraron 3 categorías: menor de 25 años, entre 25 y 55 años, y mayor de 55

años. Para la etiología se utilizaron las categorías intencional, dopaje, iatrogénica y desconocida (cuando no se pudo establecer mediante la anamnesis)

La investigación cualitativa de diuréticos del CENATOXA incluyó la investigación de la presencia de los siguientes diuréticos: acetazolamida, amilorida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bumetanida, clortalidona, espironolactona (y su metabolito, canrenona), furosemida, hidroclorotiazida, indapamida y triamtireno. La metodología utilizada en la investigación, descrita previamente por Olmos y col. (2000), incluyó extracción en fase sólida de la orina y cromatografía en capa delgada del extracto. Todos los resultados positivos fueron confirmados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. El análisis de los resultados se realizó aplicando herramientas de Microsoft Excel® (2010). Las comparaciones estadísticas se realizaron con InfoStat® (versión libre).

Resultados

Entre el 1 de enero de 2002 y el 31 de diciembre de 2016 ingresaron al CENATOXA 138 casos para investigación de diuréticos en orina. De los 138 casos, el 88 % (n=122) fueron mujeres, el 9 % (n=12) fueron hombres y el 3 % (n=4) sin datos de género. Las edades estuvieron comprendidas entre los 5 y los 73 años.

Con respecto a los resultados, el 56 % (n=77) fueron positivos para algún diurético y el 44 % (n=61) fueron negativos (*Tabla 1*).

Del total de casos con resultado positivo, el 93,5 % (n=72) fueron mujeres, el 2,6 % (n=2) fueron varones y el 3,9 % (n=3) fueron derivaciones sin información de género. La edad, en los casos con resultado positivo, estuvo comprendida entre los 19 y los 66 años para las mujeres y entre 48 y 68 para los hombres.

En cuanto a la distribución etaria de los casos con resultado positivo, el 67,5 % (n=52) estuvo comprendido en la franja entre 25 y 55 años, el 16,9 % (n=13) en la de más de 55 años y el 14,3 % (n=11) no tenía información de edad (*Tabla 1*). En la franja etaria entre 25 y 55 años, el 96,1 % (n=49) de los casos con resultado positivo fueron mujeres. Esta franja, a su vez, se dividió en 4 subgrupos de edad mostrando una mayor frecuencia de uso inapropiado en el subgrupo de 40 a 49 años (*Figura 1*).

El 68,8 % de los casos con resultado positivo presentó hipocalcemia. Los valores de potasio en este grupo estuvieron comprendidos entre los 1,6 y los 3,3 mEq/l. Entre los casos con re-

sultado negativo para diuréticos, el 41% presentó hipocalcemia con valores de potasio plasmático entre 0,9 y 3,2 mEq/l. No se encontró diferencia significativa en los valores de potasio plasmático entre los grupos con resultado positivo y negativo para diuréticos ($[K^+]$ promedio = 2,63 mEq/l para el grupo con resultados positivos, $[K^+]$ promedio = 2,54 mEq/l para el grupo con resultados negativos, prueba *t*, $P=0,3850$). En el 67,5 % de los casos con resultado positivo, la etiología pudo asignarse a partir de la información obtenida mediante la anamnesis al familiar, de la historia clínica o de la epicrisis, y se distinguió un predominio de la etiología intencional (62,3 %). En el 32,5 % restante no pudo asignarse la etiología por falta de acceso a las fuentes de información antes mencionadas (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los casos estudiados según resultado del análisis, género, edad, presencia de hipocalcemia y etiología de la intoxicación.

| | Resultado del análisis | | | |
|---------------|------------------------|------|----------|------|
| | Positivo | | Negativo | |
| | N | % | N | % |
| Casos totales | 77 | 55,8 | 61 | 44,2 |
| Género | | | | |
| masculino | 2 | 2,6 | 10 | 16,4 |
| femenino | 72 | 93,5 | 50 | 82,0 |
| sin datos | 3 | 3,9 | 1 | 1,6 |
| Edad (años) | | | | |
| menor de 25 | 1 | 1,3 | 3 | 4,9 |
| 25 a 55 | 52 | 67,5 | 29 | 47,5 |
| mayor de 55 | 13 | 16,9 | 13 | 21,3 |
| sin datos | 11 | 14,3 | 16 | 26,2 |
| Hipocalcemia | | | | |
| sí | 53 | 68,8 | 25 | 41 |
| no | 2 | 2,6 | 4 | 6,6 |
| sin datos | 22 | 28,6 | 32 | 52,4 |
| Etiología | | | | |
| intencional | 48 | 62,3 | 31 | 50,8 |
| desconocida | 3 | 3,9 | 7 | 11,4 |
| dopaje | 1 | 1,3 | 1 | 1,6 |
| iatrogénica | 0 | 0 | 0 | 0 |
| sin datos | 25 | 32,5 | 22 | 36,1 |

N: número

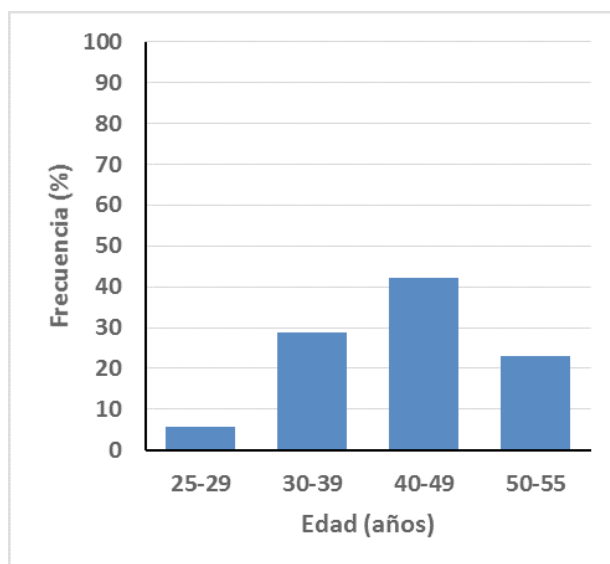


Figura 1. Frecuencia de resultados positivos dentro de la franja etaria 25 a 55 años, según subgrupos de edad.

Entre los diuréticos identificados se encontraron hidroclorotiazida, furosemida y espironolactona. Se identificó hidroclorotiazida en el 83 % ($n=64$) de los casos, la furosemida se identificó en el 69 % ($n=53$) de los casos y la espironolactona se identificó en el 5 % ($n=4$) de los casos.

En el 45 % ($n=35$) de los casos positivos se identificó un solo diurético, en el 52 % ($n=40$) se identificaron dos diuréticos, y en un 3 % ($n=2$) se identificaron tres diuréticos (Figura 2). De los casos con un único diurético identificado, la hidroclorotiazida estuvo presente en el 69 % de los casos y la furosemida en el 31 %. De los casos con dos diuréticos identificados, en el 95 % ($n=38$) se identificaron hidroclorotiazida y furosemida, y en 2 casos se identificaron furosemida y espironolactona; mientras que solo existieron 2 casos donde se identificaron tres diuréticos, hidroclorotiazida, furosemida y espironolactona (Figura 2).

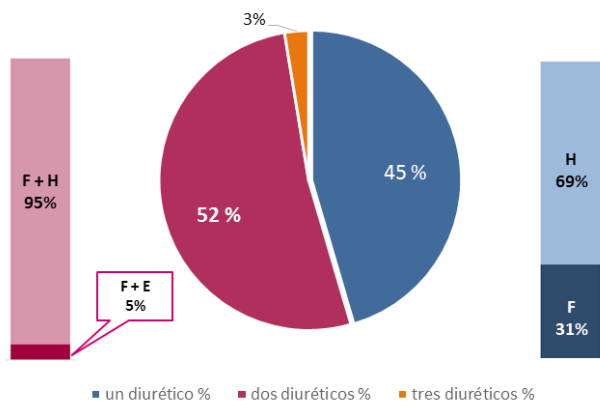


Figura 2. Distribución porcentual de los casos con resultado positivo según en número de diuréticos encontrados y según el/los diuréticos identificados. F= furosemida, H= hidroclorotiazida, E= espironolactona

El análisis de los resultados cualitativos mostró que el perfil de uso inapropiado de diuréticos se modificó con los años en relación con el diurético involucrado. El estudio retrospectivo permitió dividir el análisis en dos períodos de 7 y 8 años. Entre los años 2002 y 2008 (7 años), se identificó hidroclorotiazida en el 68 % de los casos ingresados, seguida de furosemida en el 21 % de los casos, mientras que la combinación hidroclorotiazida y furosemida se identificó solamente en el 5 % de los casos (Figura 3, primera columna). Entre los años 2009 y 2016 (8 años), la combinación hidroclorotiazida y furosemida se identificó en el 60 % de los casos ingresados, hidroclorotiazida sola se encontró en el 19 % de los casos y furosemida sola se identificó en el 15 % de los casos (Figura 3, segunda columna).

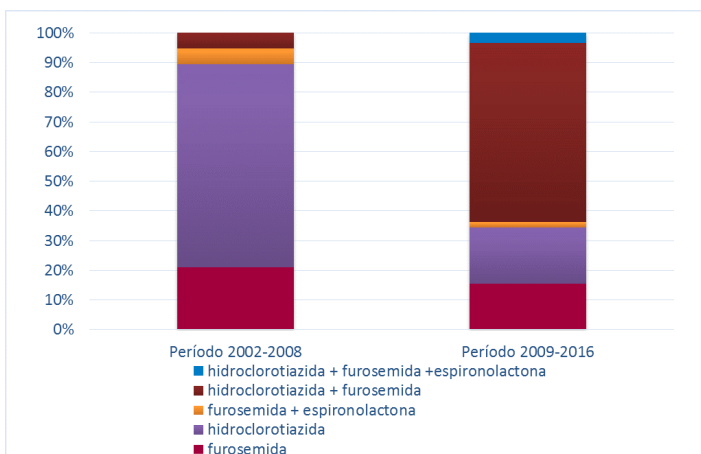


Figura 3. Distribución porcentual de los casos positivos, según los diuréticos identificados, en dos períodos de tiempo (2002-2008 y 2009-2016).

Por último, se observó recurrencia en el 8 % de los casos. En 15 años, la investigación de diuréticos en orina se solicitó más de una vez para 11 pacientes. La repetición fue de entre 2 y 5 veces según el caso. La frecuencia varió desde una recurrencia en 3 años, hasta 4 recurrencias en 2 años. El 100 % de los casos fueron mujeres, con un 84% de resultados positivos (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las 11 pacientes que presentaron recurrencia en el consumo de diuréticos.

| Paciente | Género | Rango etario | Nº análisis solicitados | Nº de resultados positivos | Diuréticos encontrados cada vez |
|----------|--------|----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1 | F | 25 a 55 | 2 | 2 | H+F/H |
| 2 | F | 25 a 55 | 3 | 3 | H+F/H+F/F |
| 3 | F | mayor de 55 | 2 | 1 | H+F |
| 4 | F | 25 a 55 | 2 | 2 | H+F/H+F |
| 5 | F | 25 a 55 | 4 | 2 | H+F/H+F |
| 6 | F | 25 a 55 | 3 | 3 | H+F/F/H |
| 7 | F | 25 a 55 | 5 | 5 | H+F/F/H+F/H+F/H+F |
| 8 | F | 25 a 55 | 4 | 2 | H+F/F |
| 9 | F | 25 a 55/ mayor de 55 | 2 | 2 | H+F/H+F |
| 10 | F | 25 a 55 | 2 | 2 | H/H |
| 11 | F | 25 a 55 | 2 | 2 | H+F/F |

H+F= hidroclorotiazida y furosemida, H=hidroclorotiazida, F=furosemida

Discusión

El consumo de diuréticos fuera de la prescripción médica, es decir, sin que exista una indicación clínica real, se encuentra asociado principalmente a trastornos de la alimentación (anorexia nerviosa o bulimia) o a intentos de enmascarar el uso de sustancias prohibidas en competiciones deportivas de alto rendimiento (Wile 2012; O'Malley 2015).

En la Argentina, la dispensación de diuréticos debe realizarse exclusivamente en farmacias y con receta médica, aunque también la administración puede realizarse en centros de salud

(hospitales, clínicas y sanatorios), siempre bajo indicación médica. Sin embargo, la auto-prescripción de diuréticos, así como de otros medicamentos de venta bajo receta ocurre para uno de cada cuatro medicamentos vendidos (Coscia 2016; IEPS 2016). Sumado a ello, en los últimos años aparece la publicidad y oferta de medicamentos por *Internet*, medios gráficos, audiovisuales y correo electrónico, expresamente prohibida (la publicidad) por la Ley 16.463/64 (Ley de medicamentos 1964), en el artículo 19 y (la venta en línea) por la Disposición 4980/2005 de la ANMAT (ANMAT 2005). Esta creciente publicidad y oferta de medicamentos por *Internet* preocupa, no solo a las autoridades sanitarias en la Argentina, sino en todo el mundo. Los productos que contienen diuréticos se publicitan como de origen "natural" y prometen una reducción rápida del peso corporal. La demanda de estos productos puede entenderse por la falsa creencia de que son naturales y que, por lo tanto, no causan efectos adversos a la salud. Ya desde la solicitud del análisis, en la casuística del CENATOXA, se destaca un elevado porcentaje de pacientes mujeres. Esto mismo también se ve representado en el alto porcentaje de mujeres, con relación a los resultados positivos. Esta distribución de género tiene su interpretación en que, entre las situaciones asociadas al uso inapropiado de diuréticos, se encuentran los trastornos alimenticios y, según datos aportados por centros especializados en bulimia, anorexia y sobrepeso, en la Argentina entre el 12 % y el 15 % de los adolescentes padecen anorexia o bulimia nerviosa, siendo el 90 % mujeres y el 10 % varones (Quiroga 2009). En concordancia, Brener y colaboradores (2011) mencionan que este tipo de trastornos de la conducta alimentaria afecta principalmente a mujeres, con estimaciones de la relación de mujeres a hombres que varían de 6 a 1 a 10 a 1.

La frecuencia y la prevalencia de trastornos de la alimentación, en relación a la edad, han sido escasamente estudiadas en nuestro país, y los estudios realizados involucraron exclusivamente población adolescente (Quiroga y col. 1998; Rutzstein y col. 2010). En uno de ellos (Rutzstein y col. 2010), realizado en adolescentes entre 13 y 18 años, se declara el uso de diuréticos como conducta compensatoria inapropiada. Sin embargo, en nuestro estudio, los casos en la franja etaria de menores de 25 años fueron escasos como para permitir un análisis. Por otro lado, no hay información publicada sobre la frecuencia de trastornos de la alimentación

en población adulta en Argentina, así como tampoco acerca del uso inapropiado de diuréticos como conducta compensatoria. En el caso de este trabajo, se observó un mayor porcentaje de resultados positivos en la franja etaria de 25 a 55 años y, especialmente, en el sub-grupo de 40 a 49 años.

La hipocalemia es un signo común en pacientes medicados con diuréticos, especialmente con tiazidas (Rodenburg y col. 2014; Veltri y Mason 2015). Suele presentarse entre las 2 a 8 semanas de iniciado el tratamiento (o el uso inapropiado) con el diurético (Blanning y Westfall 2001). Sin embargo, varios otros medicamentos pueden inducir hipocalemia (Veltri y Mason 2015). En este análisis, la hipocalemia estuvo presente en casi el 70 % de los casos positivos y en el 41 % de los casos negativos. Si bien la frecuencia de presentación de hipocalemia fue mayor en los casos positivos que en los negativos, la magnitud de la hipocalemia no resultó significativamente diferente.

Del panel de once diuréticos investigados, en esta casuística solo se identificaron tres: hidroclorotiazida, furosemida y espironolactona. Dos de ellos, hidroclorotiazida y furosemida, son los más vinculados con casos de uso inapropiado en la bibliografía (Brener y col. 2011; Angulo Sánchez y López Álvarez 2014; Pal y Sachdeva 2016). El tratamiento crónico con hidroclorotiazida (Rodenburg y col. 2014) o furosemida (Angulo Sánchez y López Álvarez 2014) induce hipocalemia, por eso algunas veces se aplican tratamientos combinados con diuréticos ahorradores de potasio como espironolactona, triamtireno o amilorida (Blanning y Westfall 2001). En este análisis, la espironolactona fue el único diurético ahorrador de potasio identificado. El diurético más frecuentemente identificado, según esta casuística, fue la hidroclorotiazida, seguido por la furosemida. Coincidentemente, el diurético con mayor presencia en el mercado de medicamentos es la hidroclorotiazida con 53 % (como monodroga y en asociaciones), seguida por la furosemida con 19 % de presencia (Alfabeta.net 2018, SIAF 2018).

Lo interesante para destacar de este trabajo fue la identificación de más de un diurético en un mismo paciente. La mayoría de los resultados positivos involucró la presencia de dos diuréticos, hidroclorotiazida y furosemida en una misma muestra de orina. La combinación de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA), hidroclorotiazida y furosemida, no existe en ninguna especialidad medicinal comercializada en la Ar-

gentina, por esa razón, su hallazgo en la orina llama la atención. Esta combinación comenzó a detectarse a partir del año 2008 y se transformó en el resultado más frecuentemente encontrado en el período 2009-2016. Sin embargo, la fuente de los diuréticos permanece desconocida. La información sobre qué medicamento, preparado o "suplemento" consumen los pacientes, no se obtuvo mediante la anamnesis realizada a los familiares en el CENATOXA, ni tampoco vino incluida en las epicrisis que se remiten con la solicitud de análisis. En general los pacientes niegan el uso inapropiado de diuréticos, incluso cuando son confrontados con el resultado positivo del análisis. Por lo tanto, para interpretar estos resultados, nos permitimos elaborar algunas potenciales explicaciones. La primera explicación del hallazgo de los dos diuréticos podría ser como consecuencia del uso inapropiado de más de una especialidad medicinal que contenga diurético como IFA. Teniendo en cuenta que los medicamentos que contienen diuréticos pueden adquirirse sin prescripción médica (Coscia 2016), esta explicación podría ser factible. La segunda explicación contempla el consumo regular de preparados magistrales que contengan ambos diuréticos (en un mismo o en distintos preparados) (Ochoa Talavera y col. 1996, ANMAT 2002). La tercera incluye el consumo regular de productos herbales para perder peso (adulterados con diuréticos). Diuréticos como furosemida e hidroclorotiazida fueron identificados como adulterantes de productos herbales formulados para perder peso, comercializados en Brasil (Moreira y col. 2013). Ching y col. (2018) describieron un panel de 487 medicinas tradicionales chinas y otros productos para la salud, comercializados en Hong Kong, adulterados con 1234 medicamentos. La hidroclorotiazida, el único diurético identificado, fue encontrada en el 6,4 % de los productos. La cuarta explicación sería la combinatoria de alguna de las situaciones anteriores.

En esta casuística, se destacó la etiología intencional (probablemente relacionada al uso inapropiado en casos de trastornos de la alimentación). Si bien los casos de dopaje podrían considerarse como intencionales, en nuestro análisis se consideraron como una categoría separada, la cual no resultó significativa. Una tercera etiología de intoxicación con diuréticos es la iatrogénica, que está descripta como *morbis diureticus* en la bibliografía (Wehling 2013; Kuhn-Thiel y col. 2014) y que se presenta en personas de edad avanzada, generalmente po-

limericadas. No se identificó ningún caso de esta última etiología en esta casuística.

Por último, la recurrencia en el consumo de diuréticos fue el mejor indicador de abuso de diuréticos. Tanto la paciente con dos resultados positivos en el término de 3 años, como la paciente con 5 resultados positivos en 2 años pueden considerarse casos de abuso de diuréticos. Tozzi y colaboradores (2006) definieron 4 categorías de abuso según la frecuencia de consumo de laxantes y diuréticos: a) rara vez (menos de dos veces por semana y/o en dosis bajas), b) a veces (al menos dos veces por semana y/o en dosis moderadas), c) frecuentemente (hasta una vez al día y/o en dosis altas) y d) muy frecuentemente (varias veces al día y/o en dosis altas). En el caso de este trabajo, no fue posible establecer una frecuencia de consumo ya que, en ningún caso los pacientes comunicaron voluntariamente el consumo de diuréticos, pero se presume que al haber requerido internación los pacientes debieron haber consumido regularmente durante varias semanas (Blanning y Westfall 2001) o debieron haber ingerido dosis elevadas.

Conclusión

El consumo de diuréticos sin indicación médica (uso inapropiado) es peligroso dadas las alteraciones hidroelectrolíticas que conlleva. Los datos del CENATOXA indicaron que los diuréticos involucrados en el uso inapropiado son, principalmente, la furosemida y la hidroclorotiazida, y que su abuso lleva a la internación de los pacientes por la aparición de signos y síntomas de intoxicación. La etiología que prevalece es la intencional y se presenta mayoritariamente en mujeres de entre 25 y 55 años de edad. El perfil de diuréticos encontrados que se reporta hasta el año 2008 se diferencia del reportado entre 2009 y 2016, período en el que parece afianzarse el abuso de la combinación de furosemida e hidroclorotiazida. Aún no está clara la fuente de esta combinación de diuréticos, la cual, sumada a la recurrencia, son factores que contribuyen a la toxicidad. Estos resultados sugieren que el uso inapropiado de diuréticos es una situación que debería ser observada más atentamente para establecer mejor su alcance y sus riesgos.

Bibliografía citada

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Disposición ANMAT 4980/2005 [en línea]. [Consulta: 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.>

anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Normas-Generales/Disposicion_ANMAT_4980-2005.pdf.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Disposición ANMAT 2316/2002. [en línea]. Buenos Aires 23 de mayo de 2002. [Consulta: 26 de julio de 2018]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Disposicion_2316-2002.pdf.

Alfabeta.net. Manual Farmacoterapéutico On Line. [en línea]. 2018. [Última actualización: 10 de septiembre de 2018, consulta: 16 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.alfabeta.net/medicamento/index-ar.jsp>.

Angulo Sánchez A.M., López Álvarez A. Hipopotasemia severa por abuso de diuréticos. Apuntes de Ciencia. Boletín Científico del Hospital General Universitario de Ciudad Real (HGU-CR). 2014. [en línea]. [Consulta: 16 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://apuntes.hgu-cr.es/2014/12/05/hipopotasemia-severapor-abuso-de-diureticos/>.

Blanning A., Westfall J.M. How soon should serum potassium levels be monitored for patients started on diuretics? *J Fam Pract.* 2001;50(3):207-208.

Brener Z.Z., Medvedovsky B., Winchester J.F., Bergman M. Hypokalaemia in a woman with eating disorder. *Grand Rounds.* 2001;11:53-55.

Cadwallader A.B., de la Torre X., Tieri A., Botrè F. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. *Br J Pharmacol.* 2010;161(1):1-16.

Chemocare.com. Hipokalemia (niveles bajos de potasio en sangre). [en línea]. Chemocare. 2018. [Consulta: 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/side-effects/Hipokalemia.aspx>.

Ching C.K., Chen S.P.L., Lee H.H.C., Lam Y.H., Ng S.W., Chen M.L., Tang M.H.Y., Chan S.S.S., Ng C.W.Y., Cheung J.W.L., Chan T.Y.C., Lau N.K.C., Chong Y.K., Mak T.W.L. Adulteration of proprietary Chinese medicines and health products with undeclared drugs: experience of a tertiary toxicology laboratory in Hong Kong. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(1):172-178.

Coscia L. Entre el derecho a la automedicación y el riesgo de autoprescripción. Conclusión, 10 de julio de 2016. 2016 [en línea]. (Consulta 16 de mayo de 2018) Disponible en: <https://www.conclusion.com.ar/info-general/entre-el-derecho-a-la-automedicacion-y-el-riesgo-de-autoprescripcion/07/2016/>

Díaz Marsá M., Alberdi-Páramo I., Niell-Galmés L. Nutritional supplements in eating disorders. *Actas Esp Psiquiatr.* 2017;45(Supplement):26-36.

Gerstein F., Woodside B. Diuretic abuse in eating disorders: Treatment protocol and case report. *Eating Disorders.* 1997;5(3):184-190.

Instituto de Estudios sobre Políticas de Salud (IEPS). El derecho humano a automedicarse... y a intoxicarse, según el pensamiento de Juan Tonelli. 2016. [en línea]. 25-7-2016. Noticias. [Consulta: 16 de mayo de 2018]. Disponible en: http://www.ieps.com.ar/es/template.php?file=notas/2016/07/16-07-25_El-derecho-humano-a-automedicarse.html.

Jackson E.K. Diuretics. En: Brunton L, Lazo J, Parker K (eds). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 11° ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 737-770.

Kuhn-Thiel A.M., Burkhardt H., Wehling M. Morbus Diureticus in the Elderly (MDE). Inappropriate Application of Diuretics Four-Case Reports. *Aging Sci.* 2014;2:3.

Kumra R., Bargman J.M. A review of diuretic use in dialysis patients. *Adv Perit Dial.* 2014;30:115-9.

Ley de medicamentos. Ley 16463. 1964. [en línea]. [Consulta: 16 de mayo de 2018]. Disponible en: http://www.cfsf2.org.ar/upload/Ley_1646364___Medicamentos.pdf.

Mayr F.B., Domanovits H., Laggner A.N. Hypokalemic paralysis in a professional bodybuilder. *Am J Emerg Med.* 2012;30(7):1324.e5-8.

Moreira A.P., Motta M.J., Dal Molin T.R., Viana C., de Carvalho L.M. Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2013;30(7):1230-7.

Nagata J.M., Garber A.K., Tabler J.L., Murray S.B., Bibbins-Domingo K. Prevalence and Correlates of Disordered Eating Behaviors Among Young Adults with Overweight or Obesity. *J Gen Intern Med.* 2018;33(8):1337-1343.

O'Malley P.A. Looking "Fit and Thin" to Win: Diuretic Drug Abuse In and Outside the Arena. *Clin Nurse Spec.* 2015;29(4):203-6.

Ochoa Talavera A., Guerra Cabrera F., Gameiro Gandarias N., Lorenzo Riera A. Reacciones adversas de las fórmulas magistrales antiobesidad. *Atención Primaria.* 1996;18(2):49-101.

Oh S.W., Han S.Y. Loop Diuretics in Clinical Practice. *Electrolyte Blood Press.* 2015;13(1):17-21.

Olmos V., Cohen A., Villaamil Lepori E.C., López C.M., Roses O.E. Aislamiento e Identificación de Diuréticos en Orina por Cromatografía en Capa Delgada. *Acta Toxicol Argent.* 2000;8(1):13-15.

Pal S., Sachdeva B. Hypokalemia: Do Not Forget Diuretic Abuse. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(5):A83.

Quiroga S. Prevalencia e incidencia en la actualidad: Trastornos de la conducta alimentaria. [en línea] *Encrucijadas.* 2009; 46. Universidad de Buenos Aires. [Consulta 16 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://repositorioubasibsi.uba.ar>

Quiroga S.E., Zonis Zukerfeld R., Zukerfeld R. Conductas alimentarias y factores psicopatológicos en mujeres ingresantes en la Universidad de Buenos Aires. *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Psicología.* 1998;2:113-135.

Rodenburg E.M., Visser L.E., Hoorn E.J., Ruyter R., Lous J.J., Hofman A., Uitterlinden A.G., Stricker B.H. Thiazides and the risk of hypoka-

lemia in the general population. *J Hypertens.* 2014;32(10):2092-7.

Roush G.C., Sica D.A. Diuretics for Hypertension: A Review and Update. *Am J Hypertension.* 2016;29(10):1130-1137.

Rutzstein G., Murawski B., Elizathe L., Scapatura M.L. Trastornos alimentarios: Detección en adolescentes mujeres y varones de Buenos Aires. Un estudio de doble fase. [en línea]. *Revista mexicana de trastornos alimentarios.* 2010;1(1):48-61. [Consulta: 26 de julio de 2018] Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-15232010000100006&lng=es&tlng=pt.

Sistema Integral de Atención de Farmacias (SIAF). [en línea]. SP V2.0.20160420 2018. [Consulta: 16 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.siaf.com.ar/>.

Tozzi F., Thornton L.M., Mitchell J., Fichter M.M., Klump K.L., Lilienfeld L.R., Reba L., Strober M., Kaye W.H., Bulik C.M., Price Foundation Collaborative Group. Features associated with laxative abuse in individuals with eating disorders. *Psychosom Med.* 2006;68(3):470-7.

Veltri K.T., Mason C. Medication-induced hypokalemia. *Pharmacy & Therapeutics.* 2015;40(3):185-90.

Wehling M. Morbus diureticus in the elderly: epidemic overuse of a widely applied group of drugs. *J Am Med Dir Assoc.* 2013;14(6):437-42. Wile D. Diuretics: a review. *Ann Clin Biochem.* 2012;49(Pt 5):419-31.

World Anti-Doping Agency (WADA). Prohibited list January 2019. 2018. [en línea]. [Consulta: 9 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf.

Concentración de aluminio en carne cocida almacenada en bandejas de aluminio descartables

Aluminum concentration in cooked beef stored in disposable aluminum trays

Iezzi, Sebastián^{1*}; Lifschitz, Adrian¹; Landa, Roberto³; Quiroga, Miguel Angel³; Purslow, Peter P²

¹Centro de Investigación Veterinaria de Tandil, (CIVETAN, CONICET-CICPBA), ²Departamento de Tecnología y Calidad de los Alimentos, ³Laboratorio de Minerales, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina
*siezzi@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 01 de agosto de 2018

Aceptado: 06 de marzo de 2019

Resumen. El aluminio puede ser consumido por personas a través de la contaminación de alimentos y el agua. Los metales pesados en alimentos de origen animal son un riesgo potencial para la salud de los consumidores. En algunos países, es una práctica habitual que las comidas cocinadas listas para el consumo se presenten y mantengan calientes en bandejas de aluminio en tiendas minoristas, como locales de comida rápida y supermercados. No hay información disponible sobre el desprendimiento de metal en este tipo de recipiente de conservación de alimentos. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de aluminio en la carne y en los líquidos de cocción almacenados en bandejas de aluminio descartables. El diseño del estudio incluyó carne bovina cocida almacenada sola, en una salsa acuosa de hierbas a pH 7, y en una salsa acuosa cítrica (a base de limón) a pH 4, para simular condiciones encontradas en la práctica minorista. El Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios estableció una ingesta semanal tolerable provisional de 2 mg Al kg⁻¹ de peso corporal. Una sola porción de 250 g de carne en salsa ácida almacenada en una bandeja de aluminio calentada durante 1, 2, 4 u 8 horas contribuiría con 0,9%, 3,4%, 6,9% y 19,8% respectivamente de acuerdo al límite tolerable. Aunque la carne se mantiene caliente durante largos períodos en bandejas de aluminio descartable, el contenido de aluminio no se acerca a los límites actualmente recomendados. Este estudio proporciona datos que sugieren que puede ser prudente limitar el consumo de este tipo de comidas a base de carne con salsas ácidas almacenadas calientes por tiempos extendidos en contenedores de aluminio.

Palabras clave: Carne; Consumidor; Metales; Bandejas de aluminio; Contaminación.

Abstract. Aluminium can be consumed by people through contamination of foods and in water. Heavy metals in foods of animal origin are a potential risk to the health of consumers. It is common practice in some countries that ready-to-eat cooked meals are often presented and maintained hot in aluminium trays in retail outlets such as fast food take-out stores and supermarkets. There are not available information about the detachment of metal in this kind of container food preservation. The objective of this study was to determine the concentration of aluminium in meat and cooking liquids stored in disposable aluminium trays. The design of the study included cooked beef meat stored either alone, or in an aqueous sauce of herbs at pH 7, or in a citric (base of lemon) aqueous sauce at pH 4, to simulate a range of conditions found in retail practice. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives established a provisional tolerable weekly intake of 2 mg Al kg body weight⁻¹. A single 250 g portion of meat in acid sauce stored in a heated aluminium tray for 1, 2, 4, or 8 hours would contribute 0.9%, 3.4%, 6.9% or 19.8% towards this tolerable limit, respectively. Although the aluminium content in meat held warm for long periods in aluminium foil trays does not approach the consumption limits currently recommended, this study provides data that suggest that is may be prudent to limit consumption of ready-to eat meat-based meals with acid sauces stored warm in aluminium containers for extended times.

Keywords: Meat; Consumer; Metals; Aluminum foil trays; Contamination.

Introducción

El aluminio es un elemento metálico muy abundante en la corteza terrestre y es liberado por las erupciones volcánicas. Sin embargo, solo se detectan niveles bajos en el entorno al que los seres humanos están expuestos (Exley 2013). El aluminio se usa ampliamente para la fabricación de utensilios, recipientes y materiales de embalaje doméstico. No hay riesgos evidentes para la salud del consumidor por el uso de re-

ipientes o papel de aluminio para cocinar o almacenar carnes. Sin embargo, ingerir comidas preparadas o almacenadas en estos elementos, aporta aluminio a la dieta (Thuran 2006). La administración parenteral de aluminio, a diferencia de la ingesta oral, está asociada con problemas en la salud humana, como la insuficiencia renal crónica (Klein 2005). El papel potencial de este metal en la patogénesis de

la enfermedad de Alzheimer continúa discutiéndose (Flaten 2001; Tabrizi 2007; ATSDR 2008; Tomljenovic 2011). En general, se produce una transferencia del metal cuando el aluminio se encuentra en contacto con líquidos, especialmente en medios acuosos que contienen ácidos y a temperaturas elevadas. Por ejemplo, las ollas de aluminio liberan este elemento especialmente cuando se usan para cocinar tomates, ruibarbo u otras sustancias ácidas (Neelam y Kaladhar 2000; Soni y col. 2001; Juhaiman 2010). En carnes y otros alimentos horneados con papel de aluminio, la concentración del metal aumenta entre 76% y 378% (Thuran 2006). La actual ToxGuide de la Agencia de Servicios de Salud Pública del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ToxGuide 2011) establece un nivel de riesgo mínimo (LMR) de 1 mg de aluminio / kg de peso corporal / día derivado de la exposición oral de duración intermedia (15-364 días). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) establece un límite para el agua embotellada de 0,2 mg L⁻¹ (ATSDR 2008).

En algunos países, es una práctica común que las comidas preparadas y listas para el consumo se presenten y se mantengan calientes en bandejas de aluminio en establecimientos minoristas, como tiendas de comida rápida y supermercados. Como la carne caliente y las salsas asociadas están en contacto con el aluminio de las bandejas descartables durante varias horas, los residuos de aluminio podrían transferirse a la carne. Sin embargo, no hay información bibliográfica sobre la liberación de aluminio en este tipo de alimentos comercializados. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de aluminio en la carne y en los líquidos de cocción almacenados en bandejas de aluminio desechables. El diseño del estudio incluyó carne de res cocida almacenada sin líquidos, en una salsa acuosa de hierbas a pH 7 y en una salsa acuosa cítrica (a base de limón) a pH 4 para simular un rango de condiciones que se encuentran en la práctica minorista.

Materiales y métodos

Cocción y recolección de muestras

Muestras de músculo semitendinoso bovino fresco (<72 horas *post mortem*) se obtuvieron comercialmente de un proveedor local en Tandil, Argentina. La carne se cortó en cubos de

aproximadamente 1 pulgada (2,5 cm) y se sometieron a tres tipos de cocción (a-c) en una bandeja Pyrex® en horno a 180 °C durante 35 minutos: (a) 15 muestras fueron sometidas a cocción sin líquido (cocción en seco), (b) 15 muestras en agua que contenía 20% de jugo de limón (pH 4) y (c) 15 muestras en agua que contenía 10% de hierbas (orégano, romero, perejil) (pH 7). Después de 35 minutos de cocción, se tomaron 3 muestras (como controles, sin contacto posterior con aluminio) y el resto de las muestras de carne y sus salsas en los tratamientos (b) y (c) se colocaron en bandejas de aluminio desechables y se mantuvieron a una temperatura constante de 65°C en un baño maría. Se recogieron muestras de carne y de los líquidos de las bandejas 1, 2, 4 y 8 horas después de la cocción.

Procedimientos analíticos

El contenido de aluminio de las muestras de carne se determinó usando un espectrofotómetro de absorción de atomización en la llama modelo 906AA (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia). La combustión de la llama se obtuvo con una mezcla de óxido nitroso y acetileno. Se utilizó el método de Thuran (2006), con modificaciones. Todos los reactivos usados fueron de grado analítico y los envases de vidrio se lavaron con ácido clorhídrico 1% (durante 8 horas) y se enjuagaron con agua bidestilada antes de su uso. La muestra de carne se picó y se secó a 120 °C en estufa durante 4 horas y luego se sometió a 500 °C durante 6 horas hasta obtenerlas cenizas. A las cenizas obtenidas se les realizó digestión con 5 mL de HNO₃ 2 M durante 2 minutos a 120 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se filtró con filtro Whatman No. 41. Una fracción de 2,5 mL de cada muestra líquida se digirió con 2 mL de HNO₃ 2 M. El contenido de aluminio de las muestras de cada tratamiento (a-c) y en cada tiempo de almacenamiento (4 repeticiones) se calculó a partir de curvas de calibración de lecturas de espectrofotómetro con sal de aluminio (Sigma-Aldrich) en un rango de (a) 25 - 120 µg g⁻¹ para la carne, y (b) 25 - 120 µg mL⁻¹ para líquidos de cocción (pH 4 y pH 7). Los valores de r² para estas curvas de calibración fueron 0.997-0.998. Algunas muestras de carne y líquidos de cocción se enriquecieron con cantidades conocidas de aluminio y la recuperación de estas cantidades fue del 93% para la carne y el 98% para los líquidos.

Resultados

El análisis de humedad mostró que la carne cocida utilizada para los experimentos contenía 51% de H₂O.

En la *Tabla 1* se muestran las concentraciones de aluminio ($\mu\text{g g ceniza seca}^{-1}$) detectadas en muestras de carne y líquidos de cocción en diversos tiempos de almacenamiento en bandejas de aluminio calentadas. No se encontraron concentraciones detectables de aluminio en las muestras control de carne y muestras de líquido de cocción en el tiempo 0, ya que la cocción de las muestras se realizó en una bandeja Pyrex® para evitar el contacto con el metal durante la cocción.

Al almacenar carne cocida (sin líquidos de cocción) en las bandejas de aluminio (tratamiento a), no se encontraron concentraciones detectables de aluminio durante todo el período de almacenamiento de hasta 8 horas. De manera similar, no se encontraron niveles detectables de aluminio en las muestras de carne cocidas y mantenidas con el líquido a pH 7. Sin embargo, la carne cocida y almacenada en un líquido áci-

do presentó 2,7 – 3,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ luego de una hora y 28,5 – 35,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ luego de 8 horas de almacenamiento a 65 °C. Las concentraciones más desfavorables detectadas en cada tiempo de almacenamiento fueron 3,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (1 hora), 5,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (2 horas), 11,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (4 horas) y 35,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (8 horas) de almacenamiento en bandejas.

Durante el almacenamiento a temperatura elevada, restos de aluminio pueden disolverse en el líquido de las bandejas. Para los tratamientos (b) y (c), los líquidos en las bandejas fueron las dos salsas (limón, pH 4 y hierba, pH 7) en las que se cocinó originalmente la carne. En el caso de la carne secada al horno (tratamiento a) se liberó un poco de líquido de la carne asada en la bandeja. Como el pH normal de la carne vacuna posterior al rigor mortis es 5,4-5,8, el líquido liberado se considera ligeramente ácido. En todas las muestras y tiempos de almacenamiento después de la cocción, el volumen final de líquidos medido fue en promedio de 7,6 mL. La concentración media (+/- DS) de aluminio en estas muestras líquidas se indican en la *Tabla 2*.

Tabla 1. Concentraciones medias de aluminio ($\mu\text{g Al g ceniza seca}^{-1}$) detectadas en muestras de carne almacenadas en bandejas de aluminio sin líquidos de cocción, con líquido de cocción pH 4 y con líquido de cocción pH 7. Los valores son medias +/- DE (desvío estándar).

| Muestra | Tiempo de almacenamiento en bandejas de aluminio (horas) | | | | |
|------------------------------|--|------------|-------------|-------------|--------------|
| | 0 (sin contacto) | 1 | 2 | 4 | 8 |
| Carne cocida sin líquido | ND | ND | ND | ND | ND |
| Carne cocida en líquido pH 4 | ND | 3,06 ± 0,4 | 5,34 ± 0,19 | 10,93 ± 0,4 | 31,13 ± 3,79 |
| Carne cocida en líquido pH 7 | ND | ND | ND | ND | ND |

ND= no detectable

Tabla 2. Concentración promedio de aluminio (mg mL^{-1}) en muestras de carne almacenadas en bandejas de aluminio vs tiempo (horas).

| Muestra | Tiempo de almacenamiento en bandejas de aluminio (horas) | | | | |
|-----------------------------------|--|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0 (sin contacto) | 1 | 2 | 4 | 8 |
| Carne sin líquido de cocción | ND | ND | ND | ND | ND |
| Carne con líquido de cocción pH 4 | ND | 0,07 ± 0,034 | 0,249 ± 0,119 | 0,393 ± 0,191 | 0,703 ± 0,350 |
| Carne sin líquido de cocción pH 7 | ND | ND | ND | ND | ND |

ND= no detectable

Discusión

No se encontraron concentraciones detectables de aluminio en la carne control (0 horas), ya que las muestras de carne utilizadas se obtuvieron de animales no sometidos a contaminación ambiental de aluminio y sin ingesta de metal dietético. Sin embargo, estos hallazgos no concuerdan con los hallazgos previos de Jorhem y col. (1989) y Thurán (2006), que detectaron $0,024-0,68 \text{ mg kg}^{-1}$ y $16,39 \pm 1,35 \text{ mg kg}^{-1}$ de materia seca, respectivamente, para el aluminio en la carne cruda. Por lo tanto, es evidente que, dependiendo del ambiente y la dieta de los animales, la carne cruda pueda contener algunos niveles de aluminio antes de que se consideren los efectos del almacenamiento o la cocción en los recipientes de aluminio.

La concentración de aluminio detectada a las 8 horas de almacenamiento en bandejas fue similar a la detectada por Thurán (2006) al cocinar carne bovina en papel de aluminio a diferentes tiempos y temperaturas del horno (60 min a $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 min a $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o 20 min a $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Repetto (1995) reportó que tanto el tiempo de almacenamiento cuanto la naturaleza del medio influyen en la disolución del aluminio, y que éste tiene una migración óptima desde los contenedores hacia el alimento a un pH de 3,8. En el presente trabajo, la concentración de aluminio detectada luego de 1 hora de almacenamiento en bandejas con líquido de cocción (pH 4) fue similar a la informada por Gramiccioni y col. (1996), quienes estudiaron la migración del aluminio de los envases a los alimentos en condiciones representativas de uso práctico. Los resultados de este trabajo también fueron similares a los de Müller y col. (1998) que hallaron $0,4$ a 737 mg kg^{-1} o mg L^{-1} en diferentes alimentos y 3 mg kg^{-1} de aluminio en productos de panadería cocinados en bandejas de aluminio. Las concentraciones detectadas en nuestro estudio en la carne fueron mayores que las concentraciones de $1,0-2,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento encontrados en la dieta italiana (Gramiccioni y col. 1996).

El patrón observado en las muestras líquidas fue similar al de las muestras de carne; no se detectaron concentraciones de aluminio en el líquido de cocción a base de hierbas (pH 7) o en el jugo de la carne almacenada sin líquido de cocción. Se observó un aumento constante en el contenido de aluminio del líquido de cocción ácido con mayor tiempo de almacenamiento, alcanzándose una concentración media máxima de $0,703 \text{ mg mL}^{-1}$ después de 8 horas de almacenamiento.

Una porción moderada de carne para ser consumida de una sola vez por una persona es de 250 g. La *Tabla 3* muestra la cantidad total promedio de aluminio contenida en una porción de carne de 250 g tomada de la bandeja de aluminio en cada tiempo de almacenamiento.

Estos valores calculados representan el contenido de aluminio de la carne, y no tienen en cuenta la contribución del líquido / salsa de cocción (que también podría consumirse).

Considerando la peor situación (8 horas de almacenamiento), la concentración promedio de $31,13 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de cenizas secas reportada en la *Tabla 1* corresponde a $15,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de carne, o $3,9 \text{ mg}$ de aluminio por porción de 250 g. En su guía sobre toxicidad de aluminio, la Agencia de Servicios de Salud Pública del Departamento de Salud y Servicios Humanos de E.E.UU. para sustancias tóxicas, sugiere un Límite de Riesgo Mínimo (LMR) de $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, para una persona de 70 kg (peso promedio de adulto) o un consumo total de 70 mg por día para una persona promedio. Este valor de 3,9 mg equivaldría al 5,6% del LMR en una sola porción. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA 2008) estableció una ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) para adultos de $1 \text{ mg de aluminio kg pc}^{-1}\text{semana}^{-1}$. Considerando un peso corporal promedio de 70 kg, esto equivaldría a 70 mg por semana, o 10 mg por día. Una porción de 250 g de carne en salsa ácida almacenada en una bandeja de aluminio calentada durante 1, 2, 4 u 8 horas contribuiría con un 3,8%, 6,8%, 13,9% o 39,6% a este límite diario tolerable, respectivamente. El Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios estableció una ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) de 2 mg / kg de peso corporal basada en un nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) de 30 mg / kg de peso corporal por día y la aplicación de un factor de seguridad de 100 (JECFA 2011). La ISTP se aplica a todos los compuestos de aluminio en los alimentos, incluidos los aditivos alimentarios. El cálculo con esta ISTP evidencia que una porción de 250 g de carne con salsa ácida almacenada en una bandeja de aluminio calentada durante 1, 2, 4 u 8 horas contribuiría con 1,9%, 3,4%, 6,9% o 19,8% a este límite diario tolerable, respectivamente.

El presente estudio demostró que cuando la carne se almacena con líquidos ácidos para cocinar en bandejas de aluminio, se detectan concentraciones significativas del metal en los alimentos y en el líquido de cocción. La con-

Tabla 3. Cantidad de aluminio ingerido (en mg) por el consumo de una porción de carne de 250 gramos vs tiempo de almacenamiento (horas).

| Muestra | Tiempo de almacenamiento en bandejas de aluminio (horas) | | | | |
|-----------------------|--|------|------|------|------|
| | 0 (sin contacto) | 1 | 2 | 4 | 8 |
| Carne en líquido pH 4 | 0 | 0,38 | 0,68 | 1,39 | 3,96 |

centración de aluminio en el cuerpo humano es producto del equilibrio entre la exposición (ingreso a través de la vía respiratoria, dérmica y oral) y la eliminación del metal. Aunque se considera que la biodisponibilidad del aluminio es baja, la ruta más importante de exposición no es segura. Si bien no es posible determinar con certeza cuáles son los niveles que afectan la salud humana y cuál es la vía de absorción más importante, se considera conveniente adoptar un enfoque cauteloso para reducir la exposición al aluminio (Exley 2013). Es difícil determinar la contribución de diversas fuentes de aluminio en personas que viven y trabajan en entornos variados, consumen dietas diferentes y presentan diversos niveles de residuos en el agua potable. Por ello, los comités de expertos de Estados Unidos y Europa establecen recomendaciones variadas sobre la ingesta diaria tolerable de aluminio. Si bien es recomendable contar con más estudios sobre niveles de aluminio en los alimentos procesados y la armonización de las normas entre las organizaciones federales, la opinión de los expertos actuales indica que se debe evitar el consumo excesivo de residuos de aluminio. Considerando las recomendaciones europeas y estadounidenses tratadas anteriormente, el contenido de aluminio presente en comidas preparadas mantenidas calientes en bandejas de aluminio descartables no excedería los límites recomendados de ingesta.

Las preparaciones cárnicas que se mantienen calientes en recipientes de aluminio en exhibidores podrían aportar residuos de aluminio si se cocinaran con salsas que contienen ácidos orgánicos. Hasta que se disponga de información más precisa para establecer límites seguros del consumo de aluminio para la salud humana, puede considerarse razonable el enfoque precautorio de reducir la exposición al aluminio a un mínimo. Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere evitar el almacenamiento en caliente de alimentos con

salsas ácidas en recipientes de aluminio por un tiempo prolongado.

Agradecimientos. El trabajo actual fue apoyado por el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (PCVA).

Bibliografía citada

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Public Health Statement for Aluminum. 2008. [Consulta: 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=1076&tid=34>.

European Food Safety Agency (EFSA). Safety of aluminium from dietary intake[1] - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC) EFSA Journal. 2008. [Consulta: 12 de marzo de 2018]; 754,1-34. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/754>.

Exley C. Human exposure to aluminum. Environ Sci Process Impacts. 2013;15(10):1807-1816.

Flaten T.P. Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease with emphasis on drinking water. Brain Res Bull. 2001;55(2):187-196.

Gramiccioni L., Ingrao G., Milana M.R., Santaroni P., Tomassi G. Aluminium levels in Italian diets and in selected foods from aluminium utensils. Food Addit Contam. 1996;13(7):767-774.

Joint FAO / WHO Expert Committee On Food Additives (JECFA), Seventy-fourth meeting 14-23 June. Rome. 2011. [Consulta: 3 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-at873e.pdf>.

Jorhem L., Sundström B., Åstrand C., Haeggglund G. The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminium in the meat, liver and kidney of Swe-

dish pigs and cattle. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1989;188(1):39-44.

Juhaiman L. Estimating Aluminum leaching from Aluminum cook wares in different meat extracts and milk. *J Saudi Chem Soc.* 2010;14:131-137.

Klein G.I. Aluminum: new recognition of an old problem. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5:637-640.

Müller M., Anke M., Illing-Günther H. Aluminium in foodstuffs. *Food Chemistry.* 1998;61(4):419-428.

Neelam B.M., Kaladhar M. Risk of increased Aluminum burden in the Indian population: contribution from Aluminum cookware. *Food Chem.* 2000;70:57-61.

Repetto M. *Toxicología Avanzada.* Madrid: Díaz de Santos, 1995.

Soni M.G., White S.M., Flamm W.G., Burdock G. Safety evaluation of dietary Aluminum. *Regul Toxicol Farmacol.* 2001;33(1):66-79.

Tabrizi A.B. Cloud point extraction and spectrofluorimetric determination of aluminum and zinc in food stuffs and water samples. *Food Chem.* 2007;100:1698-1703.

Thuran S. Aluminum contents in baked meats wrapped in aluminum foil. *Meat Sci.* 2006;74(4):644-647.

Tomljenovic L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *J. Alzheimers Dis.* 2011;23(4):567-98.

ToxGuide for Aluminum. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease. 2011. [Consulta: 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-22.pdf>.

Evaluación de riesgo a la salud y contaminantes en agua de bebida. Importancia de la ingesta de agua

Evaluation of health risk and contaminants in drinking water. Importance of the water intake

Othax, Natalia^{1,2}; Peluso, Fabio^{1,3}; González Castelain, José^{1,4}; Masson, Ignacio^{1,3}; Dubny, Sabrina^{1,2}

¹Instituto de Hidrología de Llanuras "Dr. Eduardo Usunoff" (UNCPBA - CIC - Municipalidad de Azul), República de Italia 780 (B7300), Azul, Buenos Aires, Argentina. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). ⁴Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Recibido: 24 de agosto de 2018

Aceptado: 09 de marzo de 2018

Resumen. Se evaluó la importancia del consumo diario de agua por ingesta en la evaluación de riesgo a la salud humana (ERS) de contaminantes presentes en agua subterránea de pozos domiciliarios en la ciudad de Azul, Argentina. El riesgo probabilístico acumulativo se calculó en base al modelo de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) para cuatro grupos de edad (5, 10, 15 años y adultos). Los resultados fueron comparados mediante la aplicación de un consumo diario de agua por ingesta estimado utilizado con frecuencia en la literatura frente a una cantidad ingerida local. De las seis variables usadas (Concentración de la sustancia peligrosa en el agua; Ingesta diaria de agua (*I*); Frecuencia de exposición; Duración de la exposición; Peso corporal del individuo expuesto; Factor de corrección para el tiempo promedio de exposición crónica), la *I* fue la variable más influyente en el valor del riesgo presentando diferencias significativas entre los resultados derivados de ambos tipos de *I*. La diferencia más alta fue en los 5 años de edad, grupo que presentó un riesgo acumulado asociado con *I* local 98% más bajo respecto del riesgo calculado utilizando *I* basada en la literatura. La selección de la *I* tuvo un impacto significativo en los resultados del riesgo, lo que sugiere una cuidadosa elección de las variables de entrada al modelo de la evaluación del riesgo para evitar subestimaciones o sobreestimaciones.

Palabras clave: Riesgo sanitario; Sustancias inorgánicas; Sustancias fenólicas; Agua de bebida.

Abstract. We evaluated the importance of the daily consumption of water by ingestion on health risk assessment (HRA) from pollutants present in shallow groundwater from residential wells in the city of Azul, Argentina. The probabilistic cumulative risk was calculated based on the model of the United States Environmental Protection Agency (USEPA) for four age groups (5, 10, 15 years and adults). The results were compared by applying a daily consumption of water by estimated intake frequently used in the literature against a local ingested amount. From the six variables used (Concentration of the hazardous substance in water, Daily water intake (*I*), Frequency of exposure, Duration of exposure, Body weight of the exposed individual, Correction factor for the average time of chronic exposure), *I* was the most influential variable in the value of risk, presenting significant differences between the results derived from both types of *I*. The highest difference was in the 5 years of age, a group that presented an accumulated risk associated with local *I* 98% lower regarding the risk calculated using *I* based on the literature. The selection of *I* had a significant impact on risk outcomes, suggesting a careful choice of input variables to the risk assessment model to avoid underestimation or overestimation.

Keywords: Health risk; Inorganic substances; Phenolic substances; Drinking water

Introducción

La evaluación de riesgos a la salud (ERS) es una herramienta de gestión que utiliza datos para estimar posibles efectos en la salud causados por la exposición con agentes físicos, químicos o biológicos dañinos en condiciones específicas de exposición (NRC 1994). El método de cuantificación aplicado con mayor frecuencia en la ERS es el enfoque determinístico (Schwab y col. 2005; Navoni y col. 2014). El modelo de ERS determinístico utiliza valores únicos para cada variable de entrada y obtiene un valor de riesgo único como resultado del modelo, sin ninguna indicación de la cantidad de incertidumbre o variación esperada alrededor de este

valor. El enfoque probabilístico puede resolver este problema al proporcionar distribuciones de probabilidad de riesgo que tengan en cuenta tanto la incertidumbre como la variabilidad de los parámetros de entrada (Burmester 1996; Thompson y Graham 1996; USEPA 2011). La ERS probabilística se ha aplicado con éxito para evaluar posibles efectos adversos para la salud de los contaminantes del agua (Hamidin y col. 2008; Chowdhury y col. 2009; Kavcar y col. 2009; Wu y col. 2011; Peluso y col. 2012 a, b; Peluso y col. 2016; Saha y col. 2017).

La decisión del investigador sobre qué valores de parámetros de exposición usar en el modelo ERS afecta la variabilidad, los niveles de incer-

tidumbre y podría inducir diferencias significativas en los resultados. Por lo tanto, las fuentes de incertidumbre y variabilidad deben tenerse en cuenta durante el proceso de ERS (NRC 1994; USEPA 2011). La cantidad de agua ingerida junto con otros parámetros del modelo de exposición (por ejemplo, concentración de la sustancia peligrosa, frecuencia y duración de la exposición, peso corporal del individuo expuesto) son tipos de variables de entrada utilizadas para calcular el riesgo en condiciones específicas por exposición a un agente potencialmente tóxico. El investigador que realiza la ERS debe definir estas "condiciones específicas" al elegir los valores de las variables de entrada para el cálculo de riesgo con el fin de minimizar el error. Estas fuentes de incertidumbre y variabilidad podrían estar asociadas a la edad del individuo expuesto, escenario de exposición (por ejemplo, la vía, la duración y la frecuencia de la exposición) y al tipo de tratamiento numérico dado a los parámetros (enfoque determinístico o probabilístico). Una vez que se aplica el modelo de riesgo, la variabilidad e incertidumbre de los parámetros de entrada se incluyen en la salida del modelo que muestra los resultados de la evaluación del riesgo.

La mayoría de las publicaciones sobre ERS en las que se utiliza el consumo de agua por ingesta, se basan en valores de consumo de agua establecidos por USEPA (Ni y col. 2009; Kumar y Xagorarakis 2010; Wu y col. 2010; Legay y col. 2011; Wu y col. 2011; Amjad y col. 2013; Pentamwa y col. 2013; Kelepertzis 2014; Şener y col. 2017; Singh y Kumar 2017, entre muchos otros). Sin embargo, las ERS en las cuales el consumo de agua por ingesta se basa en las condiciones locales son menos comunes (Kavcar y col. 2009; Phan y col. 2010; Jamaludin y col. 2013; Wongsasuluk y col. 2014).

El consumo de agua por ingesta suele ser el parámetro más influyente del análisis de riesgo, como se mencionó en un estudio anterior (Othax y col. 2014) y en otro más reciente (Fallahzadeh y col. 2018). Cuando no hay datos locales disponibles sobre el consumo de agua, se utilizan referencias de otras fuentes, lo que aumenta la incertidumbre del valor de riesgo final debido a las condiciones experimentales potencialmente diferentes en las que se estimaron.

La ciudad de Azul, provincia de Buenos Aires tiene una superficie de 90,5 km² (área urbana más periurbana). Si bien casi la totalidad de la planta urbana está cubierta por la red de agua potable, es frecuente la tenencia de pozos de

agua para consumo humano en los domicilios. Nuestra hipótesis es que la ingesta diaria de agua según la literatura (por ejemplo de USEPA) es mucho más alta que la ingesta local de pozos domiciliarios para nuestra área de estudio y esta sobreestimación de la exposición humana a contaminantes del agua podría conducir a decisiones erróneas de gestión de recursos hídricos que afectan la salud pública.

El objetivo del presente estudio es corroborar esta hipótesis comparando los resultados de ERS basados en la ingesta de agua de la literatura (USEPA 2002) con los basados en una ingesta de agua generada localmente obtenida con datos de una encuesta in-situ en la que se consideraron cuatro grupos de edades.

Material y métodos

Área de estudio

La cuenca del arroyo del Azul (6.000 km²) se encuentra en el centro de la provincia de Buenos Aires (36° 00' / 37° 20' S - 60° 12' / 58° 52' W). La ciudad de Azul, ubicada en la cuenca, es la ciudad cabecera del partido homónimo, cuenta con una población de 60.000 habitantes y es el área urbana más poblada de la cuenca. La ciudad tiene una amplia cobertura de agua potable que es suministrada por la compañía de provisión de agua de la ciudad. Esta red alcanza el 98% de los hogares. Sin embargo, a pesar de la amplia cobertura de la red de agua, hay pozos domiciliarios de aguas poco profundos que se usan ocasionalmente para beber y para otros fines (por ejemplo, ducharse), aunque su uso está prohibido por ley. Mediante el uso de agua de pozo, las personas pueden estar expuestas directa o indirectamente a sustancias tóxicas (Figura 1).

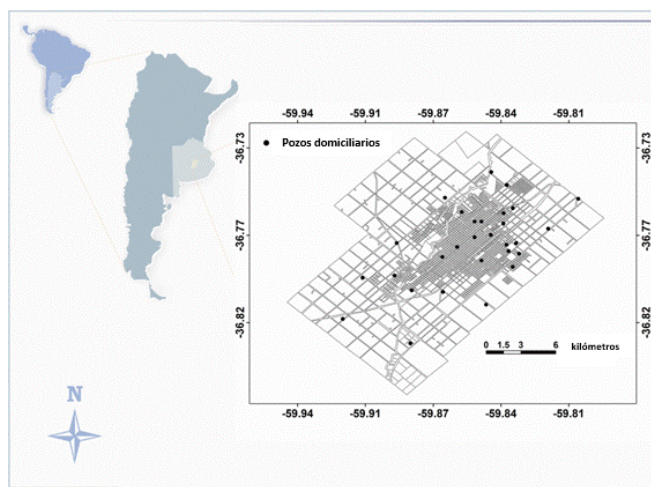


Figura 1. Ubicación del área de estudio y de los pozos domiciliarios. Ciudad de Azul, Argentina.

La estimación del riesgo se realizó en cuatro grupos de edad diferentes (5, 10 y 15 años y adultos, de 20 años en adelante) expuestos a varias sustancias peligrosas en el agua de pozo usada para beber. La dosis diaria promedio de exposición a las sustancias químicas se estimó probabilísticamente usando la *Ecuación 1* del modelo cuantitativo de USEPA (1989, 1992).

$$DDP = \frac{C * I * FE * DE}{[Pc * FC]} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

DDP = la dosis diaria promedio del contaminante debido a la ingesta de agua (mg/kg/día),

C = la concentración de la sustancia peligrosa en el agua (mg/L),

I = ingesta diaria de agua (L/día),

FE = la frecuencia de exposición (día/año),

DE = la duración de la exposición (año),

Pc = el peso corporal del individuo expuesto (kg),

FC = el factor de corrección para el tiempo promedio de exposición crónica (duración estadística de la vida humana: 30 años * 365 días).

Los valores de riesgo que representan los efectos no carcinogénicos de las sustancias peligrosas se calcularon utilizando el cociente de riesgo (*CR*) (USEPA 1989) (*Ecuación 2*), el cual implica la relación entre la dosis diaria promedio (*DDP*) y la dosis de referencia toxicológica (*DRf*) para cada sustancia química involucrada. Si *CR* es menor que 1.0, el riesgo para la salud no carcinogénico se asume no significativo (USEPA 1989).

$$CR = \frac{DDP}{DRf} \quad \text{Ecuación 2}$$

Cada variable de entrada del modelo de *DDP* se define mediante una función de densidad de probabilidad (*FDP*). En consecuencia, el *CR* es también una *FDP*. Los parámetros estadísticos se tomaron de cada *FDP* y se utilizaron como descriptores cuantitativos.

VARIABLES DE ENTRADA DEL MODELO ERS

Concentración de la sustancia peligrosa (*C*)

Las muestras estacionales de agua subterránea fueron recolectadas en 30 pozos domésticos activos (10 a 20 m de profundidad) distribuidos en toda el área urbana. El estudio totalizó 16 eventos de muestreo entre 2002 y 2007. Las muestras de agua se recolectaron de acuerdo con técnicas estándar y se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis. Las muestras de agua para determinaciones de metales y sustancias inorgánicas se colectaron en botellas de polietileno

de alta densidad. Se usaron botellas de vidrio ámbar con tapas internas de teflón para las muestras de sustancias fenólicas.

Las muestras fueron analizadas por un laboratorio certificado según lo establecido por la autoridad de protección ambiental competente. Se utilizó un espectrómetro atómico de absorción Varian SpectraAA55 para medir las concentraciones de metales (es decir, Pb, Cr, Cd) siguiendo el procedimiento estándar de la USEPA (SW 846 M 7420, SW 846 M 7190, SW 846 M 7130). Para la concentración de As, se empleó un espectrofotómetro visible Cintra 6 UV de GBC según el método SM M 3500 As C. Para la determinación de sustancias fenólicas (CAS 108-95-2) se utilizó un espectrofotómetro visible UV Cintra 6 UVC según el método USEPA SW 846 M 9065. Las concentraciones de fluoruro y nitrato se midieron utilizando espectrofotómetro Thermo Scientific AquaMate UV Vis de acuerdo a SM 4500 NO₃- B.

Las distribuciones de las concentraciones de cada sustancia fueron ajustadas a la función de distribución de probabilidad de mejor ajuste con la ayuda de Crystal Ball 7.1 (Decisioneering 2007) (*Tabla 1*). El software compara los datos de concentración con cada una de las distribuciones de probabilidad continuas (por ejemplo beta, normal, lognormal), seleccionando la que mejor se ajusta después de ejecutar las pruebas de bondad de ajuste de Anderson Darling para detectar el conjunto de parámetros de la distribución que mejor describe las características de los datos.

Las concentraciones de las sustancias no detectadas se reemplazaron por el límite superior de confianza del 95% (UCL) de la media aritmética de sus concentraciones detectadas. La estimación de UCL se realizó utilizando el software ProUCL v.3 (USEPA 2004), que realiza una serie de pruebas paramétricas y no paramétricas y sugiere el valor de UCL más apropiado para usar en función de la distribución de los datos.

Ingesta de agua (*I*), frecuencia de exposición (*FE*), duración de la exposición (*DE*) y peso corporal (*Pc*)

Las *Tablas 2* y *3* presentan los parámetros descriptivos de las diferentes variables de entrada del modelo de exposición para los cuatro grupos de edades.

La ingesta de agua (*I*) se estimó en base a encuestas realizadas en seis barrios. Los barrios se agruparon según condiciones socioeconómicas similares mediante la aplicación de un

índice de vulnerabilidad denominado Sistema Integrado de Criterios Socio-económicos (SIC) (Peluso y col. 2003).

El SIC está compuesto por variables de entrada que representan los niveles de educación, salud e ingresos tomados del censo de Población, Vivienda y Hogares de Argentina (INDEC 2001) y de un conjunto de datos locales de 2005 proporcionados por el Municipio de Azul. La aplicación del SIC permitió seleccionar tres pares de barrios agrupados por condiciones socioeconómicas similares para lograr una muestra representativa de la población de la ciudad. Las encuestas se realizaron entre diciembre de 2010 y febrero de 2011, adoptando un método de muestreo aleatorio estratificado. El número de encuestados fue 418 ($n = 418$), y

cada encuestado representó a su propio grupo familiar. Este valor n es representativo de las 6516 personas que vivían en los seis barrios. El cálculo del n se realizó según la fórmula de Sierra Bravo (1994), con datos de población según INDEC (2008). La encuesta incluyó preguntas sobre la existencia de pozos activos de agua en el hogar, volumen de agua que consumen los miembros del hogar, ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, té, jugo) composición de la familia, edad y género de los miembros de la familia, sus patrones de consumo de agua, entre otras cuestiones. Las FDP de los pesos corporales (P_c) para cada uno de los cuatro grupos de edad se basaron en Lejarraga y Orfila (1987). FE y DE fueron definidos por juicio propio (Othax y Peluso 2014).

Table 1. Límite de Cuantificación (LC, ug/L), Dosis Oral de Referencia (DR_f , ug/kg/día) y concentraciones de las sustancias presente en agua (ug/L).

| Sustancia | LC | DR_f | | T dist ¹⁾ | Min ²⁾ | Max ³⁾ | MA ⁴⁾ | DE ⁵⁾ |
|------------------------------|--------------|--------|------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | | Valor | Fuente | | | | | |
| NO ₃ ⁻ | No informado | 7.040 | USEPA 2018 | Weibull | 98,8 | 250.882 | 44.531 | 37.326 |
| F ⁻ | No informado | 60 | USEPA 2018 | Lognormal | 345 | 3.090 | 1.177 | 487 |
| Pb | 2 | 0,8 | TDP 2005 | Mínimo | 3,32 | 8,94 | 5,11 | 1,17 |
| Cr | 2 | 3 | USEPA 2018 | Logística | 2,7 | 4,26 | 2,99 | 0,245 |
| As | 3 | 0,3 | USEPA 2018 | Logística | 20 | 49,68 | 31,51 | 6,74 |
| Cd | 0,5 | 0,5 | USEPA 2018 | Logística | 1,01 | 1,79 | 1,33 | 0,117 |
| Sustancias fenólicas | 4 | 300 | USEPA 2018 | Triangular | 5,66 | 6 | 5,83 | 0,0996 |

Referencias: ¹⁾ T dist: tipo de distribución; ²⁾ Min: mínimo; ³⁾ Max: máximo; ⁴⁾ MA: media aritmética; ⁵⁾ DE: desvío estándar.

Table 2. Parámetros del modelo de distribución de probabilidad y estadísticos descriptivos de la ingesta de agua (I , L/día).

| Edad | I | | | | | | | | | | | | Valor P |
|--------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------|-----------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|----------|
| | T dist ¹⁾ | Min ²⁾ | Max ³⁾ | MA ⁴⁾ | DE ⁵⁾ | Fuente | T dist ¹⁾ | Min ²⁾ | Max ³⁾ | MA ⁴⁾ | DE ⁵⁾ | Fuente | |
| 5 | Log ⁶⁾ | 0,004 | 1,89 | 0,410 | 0,409 | USEPA 2002 | Logis ⁷⁾ | 0,000008 | 0,06 | 0,011 | 0,009 | Encuestas locales | < 0,01 * |
| 10 | | 0,003 | 1,91 | 0,43 | 0,43 | | Min ext ⁸⁾ | 0,00002 | 1,25 | 0,3295 | 0,21 | | < 0,01 * |
| 15 | | 0,007 | 2,54 | 0,55 | 0,54 | | 0,019 | 1,07 | 0,3291 | 0,20 | < 0,01 * | | |
| Adulto | | 0,148 | 3,82 | 0,95 | 0,83 | | 0,081 | 3,26 | 1,03 | 0,62 | < 0,01 * | | |

Referencias: *Diferencia significativa ($P < 0,05$); ¹⁾ T dist: tipo de distribución; ²⁾ Min: mínimo; ³⁾ Max: máximo; ⁴⁾ MA: media aritmética; ⁵⁾ DE: desvío estándar; ⁶⁾ Log: log normal; ⁷⁾ Logis: logística; ⁸⁾ Min ext: mínimo extremo.

Table 3. Parámetros del modelo de distribución de probabilidad y estadísticos descriptivos de la frecuencia de exposición (FE , días/año), duración de la exposición (DE , años) y peso corporal (P_c , kg).

| Edad | FE | | | | DE | | | | P_c | | | | | Fuente |
|--------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| | T dist ¹⁾ | Min ²⁾ | Max ³⁾ | Mo ⁴⁾ | T dist ¹⁾ | Min ²⁾ | Max ³⁾ | Mo ⁴⁾ | T dist ¹⁾ | Min ²⁾ | Max ³⁾ | MA ⁵⁾ | DE ⁶⁾ | |
| 5 | Tri ⁷⁾ | 300 | 360 | 330 | Tri ⁷⁾ | 1 | 30 | 15 | Norm ⁸⁾ | 14 | 26 | 20 | 3 | Lejarraga y Orfila 1987 |
| 10 | | | | | | | | | | 24 | 45 | 34 | 6 | |
| 15 | | | | | | | | | | 34 | 74 | 50 | 7 | |
| Adulto | | | | | | | | | | 59 | 103 | 77 | 7 | |

Referencias: ¹⁾ T dist: tipo de distribución; ²⁾ Min: mínimo; ³⁾ Max: máximo; ⁴⁾ Mo: moda; ⁵⁾ MA: media aritmética; ⁶⁾ DE: desvío estándar;

⁷⁾ Tri: triangular; ⁸⁾ Norm: normal

Resultados y discusión

La Tabla 4 presenta los percentiles 95 de la FDP de riesgo para cada sustancia y para todas las sustancias combinadas (es decir, exposición acumulada) organizadas por grupo de edad y utilizando los dos tipos de *I*. El uso de *I* basada en los datos de encuesta local representó una reducción del valor de riesgo en los cuatro grupos de edad en comparación con el uso de *I* de literatura. Los valores de riesgo acumulados disminuyeron sus rangos de 98,4% (grupo 5 años) a 29,7% (adultos).

Cuando se usó la *I* de la literatura, el riesgo acumulado disminuyó con el aumento de la edad. Sin embargo, cuando se aplicó la *I* basada en los datos de la encuesta local, la tendencia de la variación del riesgo con la edad fue diferente: adultos > 10 años > 15 años > 5 años. El adulto, respecto de los demás estratos de edades, si

bien presenta mayor Pc, presentó *I* mayores y valores de riesgo más altos. En los estratos de 10 y 15 años se presentaron valores de ingesta locales semejantes, sin embargo, este último, presentó mayores valores de Pc, respecto del estrato de 10 años y los valores de riesgo fueron menores. El estrato de 5 años, si bien presenta bajos valores de Pc, también registra bajos valores de *I*, y el menor valor de riesgo.

La comparación entre ambos tipos de FDPs de riesgo acumulativo dentro de cada uno de los cuatro grupos de edad usando la prueba de Mann-Whitney mostró diferencias significativas ($P < 0,05$). Por otro lado, la evaluación de los riesgos acumulativos asociados con cada tipo de *I* entre grupos de edad mostró que cada uno de los cuatro valores de riesgo acumulativos fue significativamente diferente entre sí según la prueba de Kruskal Wallis ($P < 0,05$).

Table 4. Resultado de riesgo (percentil 95 de la función de densidad de probabilidades de riesgo).

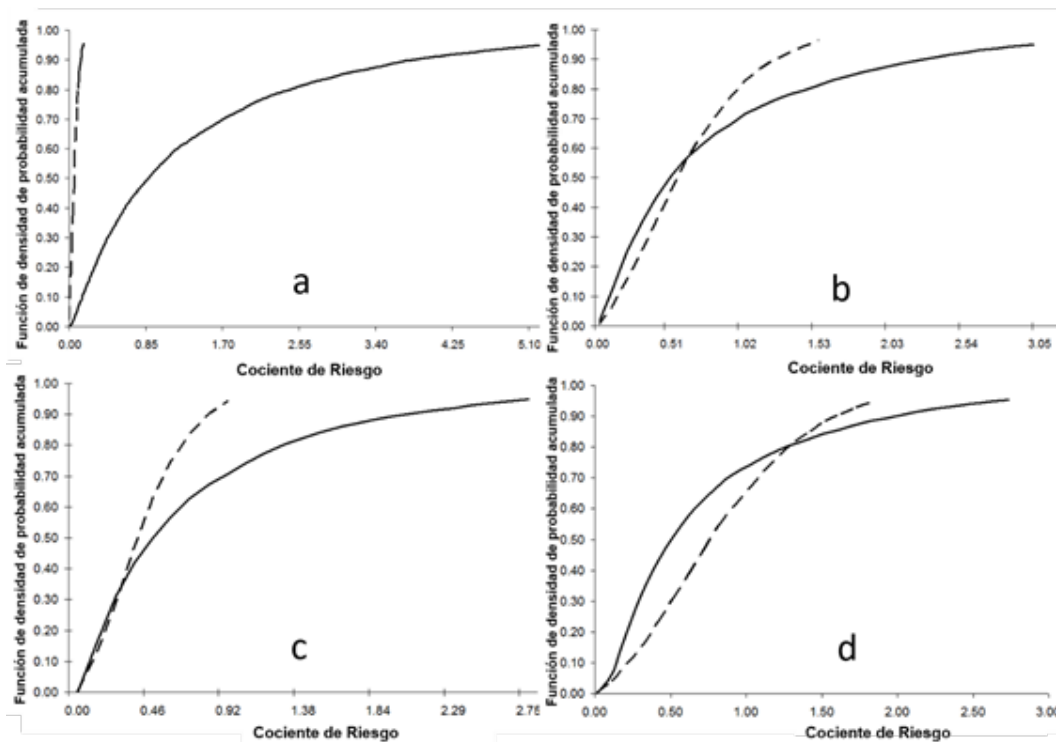
| Edad | Sustancias | | Riesgo(P ⁹⁵) | | | |
|-------------|-------------------|------------------------------|--------------------------|---------------|--------------|---------|
| | | | Ingesta literatura | Ingesta local | Diferencia % | Valor P |
| 5 | Metales | Pb | 0,231 | 0,0036 | 98,44 | < 0,01* |
| | | Cr | 0,0352 | 0,000534 | 98,48 | < 0,01* |
| | | As | 3,84 | 0,0577 | 98,5 | < 0,01* |
| | | Cd | 0,0927 | 0,00142 | 98,47 | < 0,01* |
| | Otras inorgánicas | NO ₃ ⁻ | 0,291 | 0,00528 | 98,19 | < 0,01* |
| | | F ⁻ | 0,689 | 0,0120 | 98,26 | < 0,01* |
| | Orgánicas | Sustancias Fenólicas | 0,000692 | 0,0000104 | 98,49 | < 0,01* |
| Acumulativo | | 4,98 | 0,0766 | 98,46 | < 0,01* | |
| 10 | Metales | Pb | 0,141 | 0,0674 | 52,03 | < 0,01* |
| | | Cr | 0,0222 | 0,0103 | 53,6 | < 0,01* |
| | | As | 2,33 | 1,12 | 51,92 | < 0,01* |
| | | Cd | 0,0592 | 0,0275 | 53,63 | < 0,01* |
| | Otras inorgánicas | NO ₃ ⁻ | 0,176 | 0,101 | 42,26 | 0,02* |
| | | F ⁻ | 0,457 | 0,234 | 48,67 | 0,01* |
| | Orgánicas | Sustancias fenólicas | 0,000434 | 0,000198 | 54,26 | 0,0432* |
| Acumulativo | | 3,11 | 1,44 | 53,73 | 0,281* | |
| 15 | Metales | Pb | 0,119 | 0,0439 | 63,16 | < 0,01* |
| | | Cr | 0,0184 | 0,00647 | 64,88 | < 0,01* |
| | | As | 2,01 | 0,707 | 64,81 | < 0,01* |
| | | Cd | 0,0486 | 0,0172 | 64,65 | < 0,01* |
| | Otras inorgánicas | NO ₃ ⁻ | 0,141 | 0,0633 | 55,26 | < 0,01* |
| | | F ⁻ | 0,3770 | 0,149 | 60,49 | < 0,01* |
| | Orgánicas | Sustancias Fenólicas | 0,000352 | 0,000125 | 64,36 | < 0,01* |
| Acumulativo | | 2,64 | 0,965 | 63,41 | < 0,01* | |
| Adulto | Metales | Pb | 0,114 | 0,0866 | 24 | < 0,01* |
| | | Cr | 0,0182 | 0,0126 | 30,57 | < 0,01* |
| | | As | 1,93 | 1,37 | 28,71 | < 0,01* |
| | | Cd | 0,0482 | 0,0336 | 30,26 | < 0,01* |
| | Otras Inorgánicas | NO ₃ ⁻ | 0,144 | 0,128 | 11,59 | < 0,01* |
| | | F ⁻ | 0,375 | 0,284 | 24,23 | < 0,01* |
| | Orgánicas | Sustancias Fenólicas | 0,000354 | 0,000242 | 31,5 | < 0,01* |
| Acumulativo | | 2,57 | 1,8 | 29,77 | < 0,01* | |

Referencias: *Diferencia significativa ($P < 0,05$)

La Figura 2 muestra las FDPs de riesgo acumulativo para los cuatro grupos de edad. El grupo de 5 años de edad presentó la mayor diferencia entre las FDPs de riesgo asociados con los datos de la literatura y con la *I* local (Figura 2a). El percentil 95 de 5 años de edad basado en la *I* local estaba por debajo del límite de segu-

ridad (0,0766) pero el basado en la *I* de la literatura estaba por encima de éste (4,98). Como se mencionó anteriormente, para el grupo de edad de 5 años, el uso de datos basados en la literatura representó una sobreestimación de 98,4% del riesgo en comparación con el uso de datos locales.

Figura 2. Funciones de densidad de probabilidad acumulada de riesgo hasta el percentil 95 para los cuatro grupos de edad.



Referencias: (a) 5 años, (b) 10 años, (c) 15 años, (d) adultos. Líneas discontinuas: basado en *I* de encuesta local. Líneas continuas: basado en *I* de literatura.

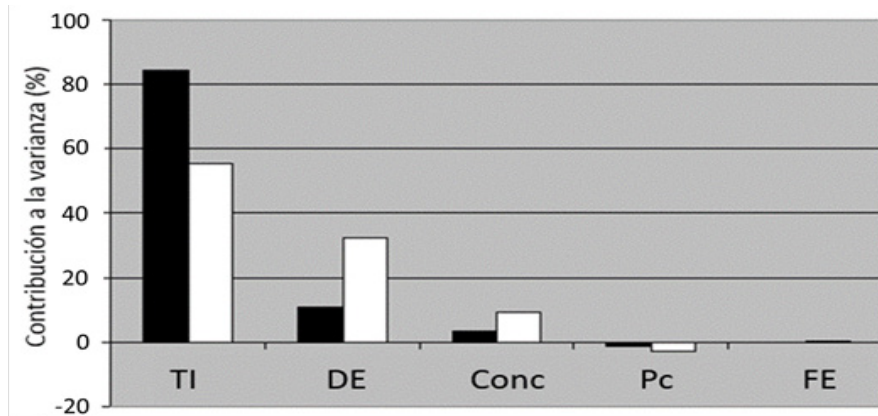
El grupo de edad adulta mostró una diferencia menor entre las FDPs de riesgo calculados utilizando la ingesta local y la ingesta de la literatura (Figura 2d). Ambos percentiles 95 de los valores de riesgo de adultos estaban por encima del límite de seguridad (los valores fueron 2,57 cuando se usó la *I* de la literatura y 1,80 cuando se usó la *I* de los datos de la encuesta local). El uso de *I* de la literatura representó una sobreestimación de riesgo de 29,7% para este estrato de edad ($P < 0,05$). Los grupos 10 y 15 años mostraron diferencias de magnitud intermedia. La sustancia más riesgosa para los cuatro grupos de edad fue As, con un valor de riesgo que representa casi el 75% del riesgo acumulado para ambos tipos de *I*. Usando la *I* de la litera-

tura, se generaron riesgos por encima del límite de seguridad, siguiendo una tendencia general de valores de riesgo-edad similar a la del riesgo acumulativo. Cuando se aplicó la *I* de la encuesta local, los valores de riesgo de As estaban por encima del límite de seguridad solo para los grupos de 10 años y adultos, aunque para el grupo de 15 años el valor estaba cerca de este límite. Para el grupo 5 años, el valor de riesgo de As estaba por debajo del límite de seguridad. Sólo dos variables de modelo de entrada variaron entre los grupos de edad: *I* y *Pc*. Para analizar qué variable fue la principal contribuyente a la FDP de riesgo, se realizó un análisis de sensibilidad basado en la FDP del riesgo acumulativo del grupo de 5 años. La variable de entrada

que más contribuyó a la variabilidad de la FDP del riesgo fue la *I* (ambos tipos de *I*) (Figura 3). La *I* contribuyó en más del 55% (*I* de encuesta local) y más del 80% (*I* basada en la literatura) a la varianza total de cada FDP del riesgo. Otra variable de entrada que varió entre los grupos de edad fue *Pc*, pero su efecto fue insignifican-

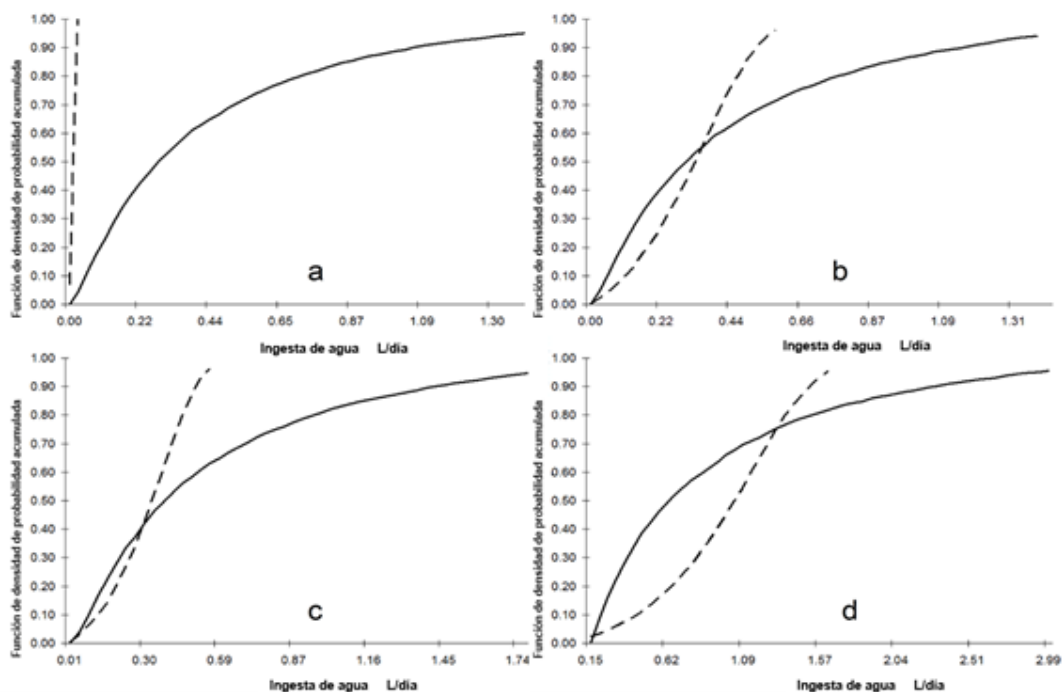
te para ambos tipos de *I* (casi -1 y -3% para la literatura y para las *I* basadas en encuestas locales, respectivamente). La gran contribución de la *I* a la FDP de riesgo, independientemente del tipo de *I*, confirma nuestra hipótesis de que la ingesta de agua es el parámetro más influyente en la HRA probabilística.

Figura 3. Resultado del análisis de sensibilidad realizado en el grupo 5 años para arsénico en agua.



Referencias: Funciones de densidad de probabilidad de riesgo basadas en la ingesta de la encuesta local (barras blancas) y en la ingesta basada en la literatura (barras negras). *I*: Tasa de ingesta; *DE*: Duración de la exposición; *Conc*: Concentración de As; *Pc*: Peso corporal; *FE*: Frecuencia de exposición.

Figura 4. Funciones de densidad de probabilidad acumulada de la *I* hasta el percentil 95 para los cuatro grupos de edad.



Referencias: (a) 5 años, (b) 10 años, (c) 15 años, (d) adultos. Líneas discontinuas: basadas en encuesta local. Líneas continuas: basadas en la literatura.

La declaración mencionada anteriormente implica que cada FDP de riesgo tenía una tendencia similar a la FDP de la *I* correspondiente. La *Figura 4* muestra ambos tipos de FDP de *I* para los cuatro grupos de edad. La *I* de la literatura varía gradualmente debido principalmente a las demandas naturales del cuerpo morfofisiológico que evolucionan con la edad.

Este cambio natural de la *I* con la edad también se aplica al *Pc* (*Tablas 3 y 4*). La relación numérica entre estas dos variables de entrada explica la tendencia seguida por el cambio de los valores de riesgo con la edad: 5 años > 10 años > 15 años > adultos. La *I* de encuesta local no cambió con la edad y, por lo tanto, el riesgo tampoco cambió. La mayor diferencia se detectó en el grupo de edad 5 años, en el que la *I* de encuesta local fue mucho más baja que la *I* basada en la literatura. Esta disparidad de ingestas de agua generó diferencias estadísticamente significativas entre los valores de riesgo. La diferencia entre ambos tipos de riesgo para el grupo de 5 años se atribuye a la gran cantidad de niños que no consumen agua de pozos poco profundos (88,88%). Esto se debe principalmente a que las madres comúnmente se niegan a ofrecer agua de pozo a sus hijos porque no se sienten seguras sobre su calidad (Othax y Peluso 2014). La diferencia fue mayor en los grupos 10 y 15 años que en el grupo de 5 años. Cuando se evalúa la exposición a contaminantes en el agua potable, el volumen de agua consumida es un parámetro esencial que se debe conocer (Ji y col. 2010; Mons y col. 2007). Aunque la *I* se usa con frecuencia como una variable de entrada determinista en los cálculos de riesgo (Lee y col. 2004; Tokmak y col. 2004; Uyak 2006; Khan y col. 2016; Rasool y col. 2015; Song y col. 2017; Wang y col. 2018), el análisis de sensibilidad mostró que la *I* tuvo el mayor impacto en el resultado de la HRA probabilística que realizamos. Esto es consistente con los resultados de estudios previos que han indicado a la *I* como el parámetro de mayor impacto (Othax y col. 2014; Fallahzadeh y col. 2018) o uno de los parámetros de mayor impacto en los resultados de riesgo (Saha y col. 2017; Zhang y col. 2017).

Hay muchos factores que podrían influir en la cantidad diaria de agua consumida, tales como las diferencias fisiológicas debido a la raza, la edad, el género, las actividades físicas, las condiciones geometeorológicas (clima y topografía) y los factores culturales (hábitos laborales y de ocio). Además, la tasa de ingesta de agua

también podría verse afectada por cambios en el estilo de vida, como las variaciones en los hábitos alimenticios.

Teniendo en cuenta todos los factores anteriores que influyen en la ingesta de agua y, por lo tanto, afectan los resultados de las evaluaciones de riesgo, nuestro estudio fue capaz de demostrar que el uso de la *I* basada en datos de la literatura podría generar una sobreestimación de riesgo del 29,7 a 98,4% según el grupo de edad considerado (adultos y 5 años, respectivamente). Por lo tanto, el volumen de agua ingerida debe determinarse cuidadosamente, ya que los supuestos basados en la literatura podrían causar escenarios de exposición poco realistas que podrían conducir a sobreestimaciones de riesgo.

Conclusiones

El estudio mostró que la ingesta de agua (*I*) fue la variable más influyente en la ERS. Los valores de riesgo presentaron diferencias significativas entre los resultados derivados de las dos *I* evaluadas (encuesta local y bibliografía) con valores de riesgo más bajos al utilizar la *I* basada en la encuesta local. La mayor diferencia fue para el grupo 5 años que presentó una diferencia de 98,4% entre ambos riesgos. La diferencia se mantuvo para los grupos 10 y 15 años, siendo del 53,7 y 63,4%, respectivamente. En adultos, la diferencia disminuyó 29,7%. La elección del valor de *I* influye en gran medida en los resultados de la evaluación del riesgo. Al conocer la tasa de ingesta de agua *in situ* y tener este valor variable discriminado por grupos de edad, se podría realizar una evaluación de riesgos más realista, evitar las sobre-estimaciones de riesgos y reducir la incertidumbre. Este trabajo contribuye al conocimiento sobre los métodos de estimación de riesgos por el consumo de agua contaminada para proteger de la salud de la población. La identificación de posibles sobreestimaciones de consumo de aguas ayudaría a evitar resultados de evaluación de riesgos inexactos y a mejorar las decisiones de gestión del agua.

Agradecimientos: El estudio fue financiado por la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA, Argentina), por la Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires (CIC, Argentina), por el Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica (CONICET, Argentina) y por la Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología (ANPCyT PID 452, Argentina). Agradecemos a Fátima Altoaguirre y Natalia de Libano por los análisis químicos y a Enrique Queupan, Matías Silicani y Joaquín Rodríguez por su valiosa ayuda durante los estudios de campo.

Bibliografía citada

Amjad H., Hashmi I., Rehman M.S.U., Awan M.A., Ghaffar S., Khan Z. Cancer and non-cancer risk assessment of trihalomethanes in urban drinking water supplies of Pakistan. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;91:25-31.

Burmester D.E. Benefits and costs of using probabilistic techniques in human health risk assessments with an emphasis on site-specific risk assessments. *Hum Ecol Risk Assess.* 1996;2(1):35-43.

Chowdhury K.H., Husain T., Veitch B., Hawboldt K. Probabilistic risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in produced water. *Hum Ecol Risk Assess.* 2009;15(5):1049-1063.

Decisioneering. Crystal Ball version 7.1 [software]. 16 de Febrero de 2007. [Consulta: 15 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.crystalball.com>.

Fallahzadeh R.A., Miri M., Taghavi M., Gholizadeh A., Anbarani R., Hosseini-Bandegharai A., Ferrante M., Oliveri Conti G. Spatial variation and probabilistic risk assessment of exposure to fluoride in drinking water. *Food Chem Toxicol.* 2018;113:314-321.

Hamidin N., Yu Q.J., Connell D.W. Human health risk assessment of chlorinated disinfection by-products in drinking water using a probabilistic approach. *Water Res.* 2008;42(13):3263-3274.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina (INDEC). Censo de Población, Viviendas y Hogares por Radios Censales para la ciudad de Azul, Buenos Aires [CD-ROM]; 2001.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina (INDEC) [en línea]. Ministerio de Economía y Producción. Secretaría de Política Económica. Estimaciones de población total por departamento y año calendario. Período 2001-2010. N° 34. Serie Análisis Demográfico. Argentina. 2008. [Consulta: 18 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.indec.gov.ar/nuevaweb/cuadros/2/estimaciones-serie34.pdf>.

Jamaludin N., Sham S.M., Ismail S.N.S. Health risk assessment of nitrate exposure in well water of residents in intensive agriculture area. *Am J Appl Sci.* 2013;10(5):442-448.

Ji K., Kim Y., Choi K. Water intake rate among the general Korean population. *Sci Total Environ.* 2010;408(4):734-739.

Kavcar P., Sofuoglu A., Sofuoglu S.C. A health risk assessment for exposure to trace metals via drinking water ingestion pathway. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212(2):216-227.

Kelepertzis E. Investigating the sources and potential health risks of environmental contaminants in the soils and drinking waters from the rural clusters in Thiva area (Greece). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014;100:258-265.

Khan S., Rauf R., Muhammad S., Qasim, M., Din, I. Arsenic and heavy metals health risk assessment through drinking water consumption in the Peshawar District, Pakistan. *Hum Ecol Risk Assess.* 2016;22(3):581-596.

Kumar A., Xagorarakis I. Human health risk assessment of pharmaceuticals in water: An uncertainty analysis for meprobamate, carbamazepine, and phenytoin. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;57(2-3):146-156.

Lee S.C., Guo H., Lam S.M.J., Lau S.L.A. Multipathway risk assessment on disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. *Environ Res.* 2004;94(1):47-56.

Legay C., Rodriguez M.J., Sadiq R., Sérodes J.B., Levallois P., Proulx F. Spatial variations of human health risk associated with exposure to chlorination by-products occurring in drinking water. *J Environ Manage.* 2011;92(3):892-901.

Lejarraga H., Orfila G. Estándares de peso y estatura para niños y niñas argentinos desde el nacimiento hasta la madurez. *Arch Arg Pediatr.* 1987;85:209-222.

Mons M.N., Van der Wielen J.M.L., Blokker E.J.M., Sinclair M.I., Hulshof K.F.A.M., Dangelndorf F., Hunter P.R., Medema G.J. Estimation of the consumption of cold tap water for microbiological risk assessment: an overview of studies and statistical analysis of data. *J Water Health* 2007;5:151-170.

National Research Council (NRC). Science and Judgement in Risk Assessment. National Academic Press, Washington, DC, 1994.

Navoni J.A., De Pietri D., Olmos V., Gimenez C., Bovi Mitre G., de Titto E., Villaamil Lepori E.C. Human health risk assessment with spatial analysis: study of a population chronically exposed to arsenic through drinking water from Argentina. *Sci Total Environ.* 2014;499:166-174.

Ni F., Liu G., Jian Y., Ren H., Yang S. Arc-GIS based rural drinking water quality health risk assessment. *J Water Resour Prot.* 2009;1(5):351-361.

Othax N., Peluso F. Riesgo sanitario por ingesta local de agua y de valores de la bibliografía en la ciudad de Azul, Argentina. Argentina [CD-ROM]. II Congreso Internacional de Hidrología de Llanuras. Santa Fé; 2014.

Othax N., Peluso F., González Castelain J. Riesgo a la salud integrado por fluoruros, nitratos y arsénico en agua subterránea: caso del partido de Tres Arroyos, Argentina. *Rev Int Contam Ambiental* 2014;30(1):27-41.

Peluso F., Gonzalez Castelain J., Rodriguez L., Othax N. Assessment of the chemical quality of recreational bathing water in Argentina by health risk analysis. *Hum Ecol Risk Assess.* 2012b;18:1186-1215.

Peluso F., Masson I., González Castelain J., Othax N., Dubny S. Uncertainties in age-and gender-based health risk assessment for recreational bathing: Arsenic in Del Azul stream, Argentina. *Hum Ecol Risk Assess.* 2016;22(3):753-774.

Peluso F., Othax N., Gonzalez Castelain J., Dubny S. Applying health risk analysis to assess the chemical quality of water for recreational bathing: Case of Tres Arroyos Creek, Buenos Aires, Argentina. *Hum Ecol Risk Assess.* 2012a;20(1):45-68.

Peluso F., Usunoff E., Entraigas I. Integración de parámetros socioeconómicos en estudios espaciales de riesgo sanitario mediante el uso de herramientas multicriterio, *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología de la Información Geográfica* 2003;(3):186-198.

Pentamwa P., Sukton B., Wongklom T., Pentamwa S. Cancer Risk Assessment from Trihalomethanes in Community Water Supply at Northeastern Thailand. *Int J Environ Sci Dev.* 2013;4(5):538-544.

Phan K., Sthiannopkao S., Kim K.W., Wong M.H., Sao V., Hashim J.H., Mohamed Yasin M.S., Aljunid S.M. Health risk assessment of inorganic arsenic intake of Cambodia residents through groundwater drinking pathway. *Water Res.* 2010;44(19):5777-5788.

Rasool A., Farooqi A., Masood S., Husain K. Arsenic in groundwater and its health risk assessment in drinking water of Mailsi, Punjab, Pakistan. *Hum Ecol Risk Assess.* 2015;22(1):187-202.

Saha N., Rahman M.S., Ahmed, M.B., Zhou J.L., Ngo H.H., Guo W. Industrial metal pollution in water and probabilistic assessment of human health risk. *J Environ Manage.* 2017;185,70-78.

Schwab B.W., Hayes E.P., Fiori J.M., Mastrocchio F.J., Roden N.M., Cragin D., Meyerhoff R.D., D'Aco V.J., Anderson P.D. Human pharmaceuticals in US surface waters: a human health risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005;42(3):296-312.

Şener Ş., Şener E., Davraz A. Assessment of groundwater quality and health risk in drinking water basin using GIS. *J Water Health.* 2017;15(1):112-132.

Sierra Bravo R. Técnicas de investigación social, teoría y ejercicios. 9a ed. Paraninfo, España, 1994.

Singh U.K., Kumar B. Pathways of heavy metals contamination and associated human health risk in Ajay River basin, India. *Chemosphere.* 2017;174:183-199.

Song T., Chen Y., Du S., Yang F. Hydrogeochemical evolution and risk assessment of human health in a riverbank filtration site, northeastern China. *Hum Ecol Risk Assess.* 2017;23(4):705-726.

Thompson K., Graham J. Going Beyond the Single Number: Using Probabilistic Risk Assessment to Improve Risk Management. *Hum Ecol Risk Assess.* 1996;2(4):1008-1034.

Tokmak B., Capar G., Dilek F.B., Yetis U. Trihalomethanes and associated potential cancer risks in the water supply in Ankara, Turkey. *Environ Res.* 2004;96:345-352.

Toxicological Profiles Database (TPD). Spatial Analysis and Decision Assistance (SADA); c2005 [actualizado el 12 de Agosto de 2005; consulta: 14 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.sadaproject.net/download.html>.

United State Environmental Protection Agency (USEPA) 2018. Integrated Risk Information System (IRIS) Database. [en línea]. c2018. [Consulta: 18 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.epa.gov/iris>.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). ProUCL Version 3.0. [software]. EPA/600/R04/079. Abril 2004 [Consulta: 25 de febrero de 2018]. Disponible en: www.epa.gov/land-research/proucl-version-30002-documentation-downloads

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Child-specific exposure factors handbook. EPA/600/P-00/002B, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Guidelines for Exposure Assessment. Fed. Reg. 57:22888-938. Washington DC, 1992.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Risk assessment guidance for superfund. Vol. I: Human health evaluation manual - Part A. EPA/540/1-89/002. Office of Emergency and Remedial Response, Washington DC, 1989.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Exposure Factors Handbook 2011

Edition (Final). (EPA/600/R-09/052F), 2011.

Uyak V. Multi-pathway risk assessment of trihalomethanes exposure in Istanbul drinking water supplies. *Environ Int.* 2006;32(1):12-21.

Wang H., Gu H., Lan S., Wang M., Chi B. Human health risk assessment and sources analysis of nitrate in shallow groundwater of the Liujiang basin, China. *Hum Ecol Risk Assess.* 2018;1-17.

Wongsasuluk P., Chotpantarat S., Siriwong W., Robson M. Heavy metal contamination and human health risk assessment in drinking water from shallow groundwater wells in an agricultural area in Ubon Ratchathani province, Thailand. *Environ Geochem Health* 2014;36(1):169-182.

Wu B., Zhang Y., Zhang X., Cheng S. Health risk from exposure of organic pollutants through drinking water consumption in Nanjing, China. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;84(1):46-50.

Wu B., Zhang Y., Zhang X.X., Cheng S.P. Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the source water and drinking water of China: quantitative analysis based on published monitoring data. *Sci Total Environ.* 2011;410:112-118.

Zhang L., Huang D., Yang J., Wei X., Qin J., Songfeng O., Zhang Z., Zou Y. Probabilistic risk assessment of Chinese residents' exposure to fluoride in improved drinking water in endemic fluorosis areas. *Environ Pollut.* 2017;222:118-125.

**Comparative study with dry crude extracts of *Ananas comosus*
L. Merrill using LC₅₀ and erythrocyte osmotic fragility as toxicity parameters
Estudio comparativo con extractos crudos secos de *Ananas comosus*
L. Merrill utilizando CL₅₀ y fragilidad osmótica eritrocitaria como parámetros de toxicidad**

Paixão, Yasmim Dayane Leal*; Oliveira, Vanessa Camylla Bernardo de; Tabosa, Maria Gabrielle de Oliveira;
Silva, Jamicelly Rayanna Gomes da; Cordeiro, Risonildo Pereira; de Melo, Arquimedes Fernandes Monteiro

Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces/Unita), Avenida Portugal, Bairro Universitário. CEP: 55016400, Caruaru, Pernambuco, Brasil. Telephone number: (81) 21032000.

*yasmimdayanee@gmail.com

Recibido: 30 de agosto de 2018

Aceptado: 22 de marzo de 2019

Resumen. *Ananas comosus*, conocido popularmente como piña, tiene una anatomía de planta bien definida y numerosos fitoquímicos farmacológicamente activos. Algunos de éstos son responsables del potencial antimicrobiano de la especie, que ha sido ampliamente estudiado dada la resistencia bacteriana a los antibióticos actualmente utilizados. Teniendo esto en cuenta, se define que la característica principal de un medicamento es la ausencia de efectos tóxicos, por lo tanto, es necesario buscar datos sobre la toxicidad de *A. comosus*, colaborando para su posible uso como fármaco. Comparando extractos hidroalcohólicos de las hojas de la corona, cáscara y pulpa de la infrutescencia, fue posible determinar que los tres extractos probados no son tóxicos, siendo el de menor toxicidad para *Artemia salina* Leach (extracto de hojas con CL₅₀ igual a 994 µg/mL) y a sangre de cordero (extracto de pulpa con porcentaje de hemólisis igual a 0,83%). Los estudios sobre principios y metodologías similares a los utilizados aquí han encontrado resultados comparables que indican la baja toxicidad de la planta. Estos resultados aportan a las investigaciones que promueven el uso de la piña como agente fitoterapéutico y reafirman su presencia en el Sistema Único de Salud de Brasil.

Palabras clave: *Ananas comosus*; Fragilidad eritrocitaria; *Artemia salina*; Piña; Eritrocito; CL₅₀

Abstract. *Ananas comosus*, popularly known as pineapple, has well defined plant anatomy and numerous pharmacologically active phytochemicals. Some of these are responsible for the species antimicrobial potential, which has been widely studied given the bacterial resistance to the currently used antibiotics. Considering this, it is defined that the main characteristic of a drug is the absence of toxic effects, thus, there is a need to seek data regarding the toxicity of *A. comosus*, collaborating for its possible use as a drug. Comparing hydroalcoholic extracts from the crown leaves, skin and pulp of the infructescence, it was possible to determine that the three tested extracts are non-toxic, being the one with the lowest toxicity to *Artemia salina* Leach (leaves extract with LC₅₀ equal to 994 µg/mL) and to lamb's blood (pulp extract with percentage of haemolysis equal to 0.83%). Studies concerning principles and methodologies similar to those used here have found comparable results stating the low toxicity of the plant. These results contribute to the research that promotes the use of pineapple as a phytotherapeutic agent and reaffirms its presence in the Brazilian Unified Health System.

Keywords: *Ananas comosus*; Fragilidad eritrocitaria; *Artemia salina*; Pineapple; Erythrocyte; LC₅₀.

Introduction

The *Ananas comosus* species (pineapple) belongs to the Bromeliaceae family, which is responsible for about 56 genera and more than 3000 species (Lopes Neto *et al.* 2015). According to Manetti *et al.* (2009) the description of the family is attributed to the French priest Charles Plumier, who, at the end of the seventeenth century, came across several different plants and decided to name them bromeliads in honour of the Swedish botanist Olaf Bromel. Belonging to this family and to the genus *Ananas*, the pineapple is popularly widespread, being considered one of the most popular tropi-

cal fruits in the world. It is also included in the group of plants with CAM metabolism (Crassulaceae Acid Metabolism), which main feature is to close their stomata during the day and open them at night to save water (Kerbauy 2004; Vieira *et al.* 2010). In Brazil, the species is found in the National Relation of Medicinal Plants of Interest to the Brazilian Unified Health System (Rennis).

It is also an herbaceous monocotyledonous (Franco 2010), perennial, with narrow, long and rigid leaves that possess serrated margins, being able to reach from 60 to 90 cm in height. It

has a tuft of leaves on its top, known as crown, and in its skin each "squama" is a true fruit that grows from a flower and merges, receiving the name of infructescence (Silva & Tassarà 2001; Crestani *et al.* 2010). It is rich in vitamins A, B and C and contains potassium, sucrose, micro-nutrients and antioxidants, carotenoids, phenolic compounds (Chakraborty *et al.* 2015a) and saponins (Da Paixão 2016). It has several pharmacologically active phytochemicals, such as anannase beta-sitosterol, campesterol, chlorogenic acid, rutin, naringenin, bromelain and flavonoid glycosides (Parle and Goel 2010). As a chemical marker it has bromelain, that is the generic name given to the set of endopeptidases and proteases present in the members belonging to the Bromeliaceae family (Chakraborty *et al.* 2015b). This enzymatic set is present throughout the pineapple.

Among the pharmacological activities observed during the *A. comosus* research, it is worth mentioning its anti-inflammatory effect, which is associated to bromelain when used in fasting, mucolytic, antimicrobial, anti-helminthic and depolymerizing of sclerotic protein fibers of connective tissue, arranged around the cellulite nodules (Manetti *et al.* 2009; Pinto 2013; Offia-Oluan and Ekwunife 2015). In popular medicine, it has recognized medicinal properties such as stomachic, carminative, diuretic and anti-inflammatory (Manetti *et al.* 2009). Its mucolytic action, popularly identified through the various expectorants made from pineapple, which are used to eliminate respiratory secretions, tends to be the most well known pharmacological activity. Despite this, it is the antimicrobial activity that has attracted considerable attention, due to the rise of bacterial resistance to the already developed and used drugs. Observing this and considering the increased number of researches in the phytotherapy area and the market of phytotherapeutic medicine, the need to explore possibilities regarding this species was strongly considered. Since the main characteristic of a drug is primarily not causing any harm that can be fatal to the user, evaluating the toxicity of the chosen material for future formulations is essential. Thus, dry crude extracts of *Ananas comosus* L. Merrill were produced and tested against *Artemia salina* Leach and the erythrocyte osmotic fragility was determined.

Materials and methods

The present study was carried out in the laboratories of Centro Universitário Tabosa de Al-

meida (Asces-Unita), in the city of Caruaru-PE. It has an experimental laboratory type design, in which the acute toxicological potential and the erythrocyte fragility of the dry crude extracts of *Ananas comosus* L. Merrill were evaluated. The exsiccate was deposited in the Instituto Agrônômico de Pernambuco – Dárdano de Andrade Lima, with registration number 91175, being Dr. Rita de Cássia Pereira the responsible for the taxonomic identification.

Preparation of the dry crude extracts of *A. comosus* L. Merrill

The infructescence of the plant drug was collected between 7-9 o'clock in the morning, observing a healthy aspect of the vegetable part. It was weighed, washed with clean running water and dried with paper towels. The crown leaves of *Ananas comosus* L. Merrill were shaded for a 24-hour period and afterwards placed in the botanical oven at 40 °C for drying, while the skin and pulp were manually reduced to small pieces and routed separately to the maceration stage. Subsequently, the dried leaves were ground in an industrial mill and sent to maceration, as well as the skin and pulp were previously: with 95% v/v hydroalcoholic solution for 7 days. After this period, the three hydroalcoholic solutions were separately filtered to obtain the fluid crude extracts. All three solutions (crown leaves, skin and pulp) were extracted in a rotary evaporator at a temperature of 60 °C. After evaporation of 95% of the solution, the extracts were stored in a vacuum desiccator and in an air circulating oven (B.O.D.), achieving total dryness and obtaining the dry crude extracts of the three parts of the plant material.

Determination of the LC₅₀ against *Artemia salina* Leach

The determination of the LC₅₀ followed the methodology described by Meyer *et al.* (1982). The eggs of *A. salina* Leach were incubated in marine solution in a plastic container, which remained under artificial light (40 W lamp) and constant temperature of 28 °C for 48 hours. After this procedure, the metanauplius stage was obtained, standard model for toxicity tests due to its higher sensitivity. For the control group the metanauplius were submitted to only 5 mL of saline water to evaluate their motility and mortality without the addition of the extracts.

Thus, 50 mg of the dry crude extracts of *Ananas comosus* L. Merrill were use, 1 mL of 5% Tween 80 being added to aid their solubilizations. The

solutions were homogenized, and the volume was completed to 5 mL with saline water at pH = 8.0. From these solutions, aliquots of 500, 375, 250, 125, 50 and 25 μL were withdrawn and transferred to test tubes previously containing 5 mL of saline, obtaining concentrations of 1000, 750, 500, 250, 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each sample. The test was performed by triplicate analysis and the samples were submitted to artificial lighting for 24 hours. After this period, the number of live and dead larvae was counted and the data tabulated using the Microcal Origin[®] 4.1 software.

Study of erythrocyte osmotic fragility (EOF)

The erythrocyte osmotic fragility test aims to measure the resistance of red blood cells to haemolysis when submitted to plant extracts (Sant'ana 2001; Rodrigues 2009). The test was based on the technique described by Darcie & Lewi (1975), in which the lamb's blood was kept under refrigeration in a vessel with glass beads to avoid its coagulation. For the control group the blood cells were submitted to only 5 mL of 0.9% saline to evaluate haemolysis of the erythrocytes without the addition of the extracts.

Fifty milligrams of the dried crude extracts of *Ananas comosus* were diluted with 0.9% saline and homogenized, and the volume of the mixture was filled up to 5 mL with 0.9% saline. From these solutions, aliquots of 500, 375, 250, 125, 50 and 25 μL were transferred to test tubes previously containing 5 mL of 0.9% saline, obtaining the concentrations of 1000, 750, 500, 250, 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each extract. Then, 25 μL of lamb's blood were added to each tube. Finally, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min at room temperature and, after this procedure; the absorbance of the supernatant of each tube was measured in a 545 nm bio-PLUS spectrophotometer. The curve regarding the percentage of osmotic fragility was obtained based on the haemoglobin absorbance value of the supernatant multiplied by the total percentage and divided by the mean absorbance value of the complete haemolysis of the erythrocytes.

Statistical analysis

The obtained information was statistically treated with Microsoft[®] Office Excel 2013 and Microcal Origin[®] 4.1 software.

Results and discussion

Lethal Concentration (LC₅₀) against Artemia salina Leach

Artemia salina Leach is a microcrustacean that presents four stages of development: egg, nauplius, metanauplius and adult (Seyfried 2010). In tests performed with this microcrustacean species, it is important to analyse criteria such as behaviour and mortality. The results obtained from this *in vivo* assay show good efficiency and correlation with *in vitro* toxicity results, suggesting it as the first cytotoxic potential analysis of new samples. In the present study, bioassays were carried out on *Artemia salina* Leach for each one of the pineapple extracts. The lethal concentrations were obtained by calculating the parameters A and B, according to the linear regression equation: $y = A + B * x$.

In which y represents a 50% probability of lethality, A is the angular coefficient and B is the linear one. These values are automatically generated when the life and death data of the microcrustacean are plotted in Microcal Origin[®] 4.1 software, in accordance with each tested concentrations of the extract. The program itself, through the linear regression equation, determines the live curve for each extract according to the concentrations and conditions that were tested. In relation to this, it is taken as a parameter that the closer to zero is the LC₅₀, the more toxic the plant is; and the closer to 1000, the lower the toxicity of the plant. In this bioassay the control group did not present changes in mobility or mortality, validating the observed results. Any changes in these parameters would indicate an execution error, implying the necessity of repetition the test. The crown leaves extract presented LC₅₀ of 994 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showing to be practically non-toxic (Figure 1).

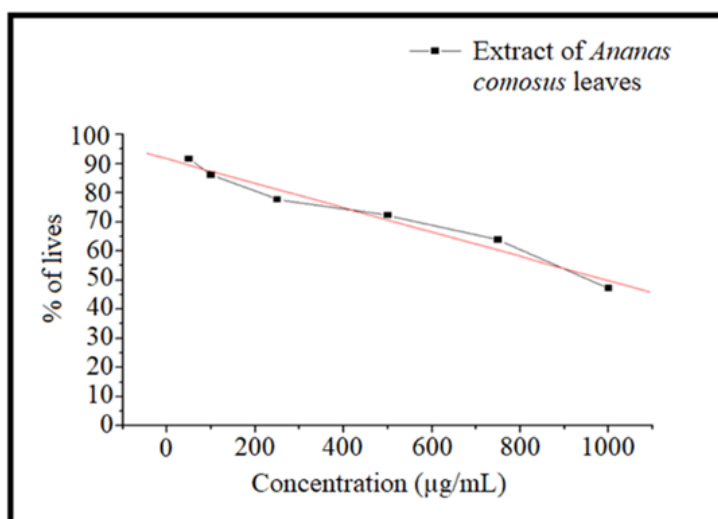


Figure 1. Graph of the percentage of live related to the concentrations of the dry crude extract of the pineapple crown leaves.

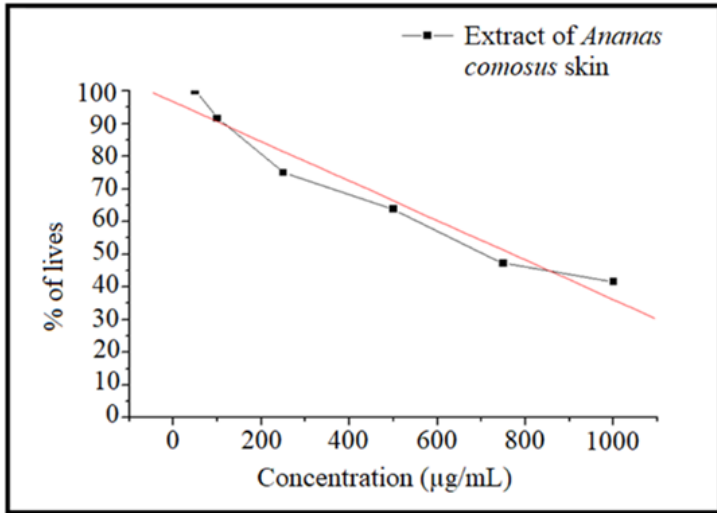


Figure 2. Graph of the determination of the LC_{50} in the tested concentrations of the pineapple skin extract.

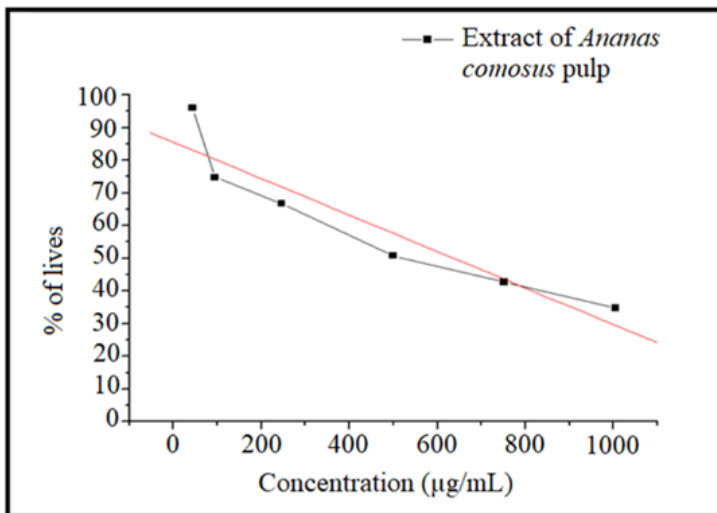


Figure 3. Percentage of live of *Artemia salina* Leach in relation to the pulp extract of *Ananas comosus* L. Merrill (pineapple).

However, the skin extract showed to be slightly toxic, with a final LC_{50} of 770 $\mu\text{g/mL}$, when applied to the linear regression equation (Figure 2). The swim ratio of the animals was slower when submitted to the three highest concentrations (500, 700 and 1000 $\mu\text{g/mL}$).

The extract of the pineapple pulp had the lowest LC_{50} , which can be described as moderately toxic when compared to the other extracts tested in this study. With a lethal concentration of 622 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3), the swim ratio of the tested animals was significantly slower when compared to the other extracts, indicating the sensitivity of *Artemia salina* Leach to the sub-

mitted extract. This can be explained thanks to the high sugar content found in the pulp of *Ananas comosus* L. Merrill and, consequently, in its extract, directly affecting the microcrustacean, which is adapted to saline environments. In a test carried out by Evangelista *et al.* (2012) that also aimed to determine the LC_{50} against the microcrustacean *Artemia salina* Leach, both pineapple pulp and skin extracts of *A. comosus* presented 100% mortality in the highest concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$. We believe that this divergence of results occurred mainly due to the different methodologies used. Evangelista *et al.* (2012) produced ethanolic extracts and applied a procedure based on the writings of Cantoria (1994), Peteros & Uy (2010), with small modifications, while the present study produced hydroalcoholic extracts and applied a technique according to the methodology of Meyer *et al.* (1982).

This same research exposed 10 metanauplius of the microcrustacean to each concentration, whereas in this one 12 metanauplius were exposed; finally, seawater was used as the natural habitat of *Artemia salina*, while the cited study used a mixture of 2.5 litres of water and 9.5 grams of sea salt obtained from a pet store (Evangelista *et al.* 2012). Among the differences found, it is believed that the production of the ethanolic extract and the use of water and sea salt to simulate the environment for *Artemia salina* were the main points that favoured the death of the species.

In agreement with the results found in this study, there is a research by Adoum (2009) that, despite the difference in the production of the sample to be tested, it concluded that the species presents low toxicity against *Artemia salina* Leach. The study developed fractions of different residues from the pineapple skin: an ethanolic fraction and other with water fraction. These were obtained by percolation with different solvents aiming the solubilization and separation of the compounds. The fractions presented values of toxicity above 1000 $\mu\text{g/mL}$, corroborating with the results found in the current study, which affirms the low toxicity of the *A. comosus* species.

Erythrocyte osmotic fragility

According to De Carvalho *et al.* (2017), red blood cells are susceptible to blood pH in several pathologies, leading to changes in acid-base balance and making them more prone to cell lysis, in other words, increasing their osmotic fragility.

Considering this, the method consists in determining the fragility of the red cells in a buffered solution when submitted to vegetal extracts. From the value of the duplicate of the tested concentrations, the mean and then the average absorbances were calculated.

The control group presented a percentage of haemolysis of 0.22%, while the pineapple crown leaves extract presented 7.19% at the highest concentration of 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Table 1) and may be seen as moderately toxic. On the other hand, the skin extract showed a percentage of haemolysis of 1.66%, with a lower lysis of red blood cells when compared to the crown leaves extract (Table 2). Therefore, the extract is considered of low toxicity in relation to the tested parameters and conditions, corroborating with the results of the bioassay against *Artemia salina* Leach.

Regarding the pineapple pulp extract, the erythrocyte osmotic fragility study presented a percentage of haemolysis of 0.83% at a concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, being classified as practically non-toxic (Table 3).

Table 1. Haemolysis percentage of the DCE of *A. comosus* crown leaves.

| Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Absorbance 1 | Absorbance 2 | Mean Absorbance | Percentage of haemolysis (%) |
|---|--------------|--------------|-----------------|------------------------------|
| 1000 | 0.094 | 0.095 | 0.095 | 7.19 |
| 750 | 0.070 | 0.075 | 0.073 | 5.53 |
| 500 | 0.045 | 0.048 | 0.047 | 3.56 |
| 250 | 0.029 | 0.025 | 0.027 | 2.04 |
| 100 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 1.13 |
| 50 | 0.002 | 0.005 | 0.0035 | 0.27 |

Table 2. Erythrocyte osmotic fragility of the skin DCE of *A. comosus*.

| Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Absorbance 1 | Absorbance 2 | Mean Absorbance | Percentage of haemolysis (%) |
|---|--------------|--------------|-----------------|------------------------------|
| 1000 | 0.020 | 0.024 | 0.022 | 1.66 |
| 750 | 0.018 | 0.019 | 0.018 | 1.36 |
| 500 | 0.018 | 0.015 | 0.016 | 1.21 |
| 250 | 0.011 | 0.011 | 0.011 | 0.83 |
| 100 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.53 |
| 50 | 0.006 | 0.005 | 0.005 | 0.37 |

Table 3. Percentage of haemolysis of the pulp DCE of *A. comosus*.

| Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Absorbance 1 | Absorbance 2 | Mean Absorbance | Percentage of haemolysis (%) |
|---|--------------|--------------|-----------------|------------------------------|
| 1000 | 0.010 | 0.011 | 0.011 | 0.83 |
| 750 | 0.004 | 0.003 | 0.004 | 0.30 |
| 500 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.22 |
| 250 | 0.000 | 0.001 | 0.0005 | 0.037 |
| 100 | 0.002 | 0.001 | 0.001 | 0.075 |
| 50 | - | 0.000 | 0.000 | 0 |

In a study carried out by Lopes Neto *et al.* (2015), the haemolytic activities of extracts of the crown leaves and the pulp of the *A. comosus* were tested. The technique consisted in incorporating extracts in different concentrations (50 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in sterilized paper disks, through the diffusion method of the samples in Blood Agar. In such manner, it is possible to detect the presence of haemolysis halos in the Petri dish. The results obtained in this study displayed that both extracts showed no toxicity at the tested concentrations, since the haemolytic activity is related to the toxicity of the plant.

According to Kaiser *et al.* (2010), the haemolytic activity is directly linked to the presence of saponins in the plant; although the *A. comosus* species is rich in saponins, these were not able to cause haemolysis in the performed test under the tested concentrations. This confirms the results of this study, in which, even at the maximum concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the pulp extract exhibited a percentage of haemolysis lower than 1%, whilst the crown leaves extract presented a percentage of 0.27% in the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the same concentration as the study of Lopes Neto *et al.* (2015), as can be seen in Table 1.

The low toxicity of *A. comosus* is confirmed by its presence in the National Relation of Medicinal Plants of Interest to the Brazilian Unified Health System (Rennisus). Despite this, the performed research sought to certify the coherence of the species in the list, finally agreeing with it. In view of the found results and since its low toxicity is confirmed by studies carried out with different types of samples from the species, such evidences lead one to believe that the pineapple can be used to manufacture pharmaceutical

products according to their already proven therapeutic activities. However, further toxicological studies regarding the species are still required.

Acknowledgments: We thank Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita) for providing the necessary equipment and facilities for the development of the study, as well as for providing the Scientific Initiation scholarship to the project of the undergraduate students Yasmim Dayane Leal Paixão and Vanessa Camylla Bernardo de Oliveira, which allowed financial support for the research. We would also like to thank the team of the laboratory of the Phytotherapy Research Group (GPFITO) that contributed to the practical stages of the study, allowing us to achieve the results.

References

Adoum O.A. Determination of toxicity levels of some savannah plants using brine shrimp test (BST). BAJOPAS.2009;2(1):135-8.

Cantoria M.C. Selected Topics in Pharmacognosy. Taguig: NAST. National Academy of Science and Technology, 1994.pp 417-30.

Chakraborty S., Rao P.S., Mishra H.N. Effect of combined high pressure-temperature treatments on color and nutritional quality attributes of pineapple (*Ananas comosus* L.) puree. Innov Food Sci Emerg Technol. 2015a;28:10-21.

Chakraborty S., Rao P.S., Mishra H.N. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. Innov Food Sci Emerg Technol. 2015b;27:57-68.

Crestani M., Barbieri R.L., Hawerth F.J., Carvalho F.I.F., Oliveira A.C. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. Cienc Rural. 2010;40(6):1473-83.

Da Paixão J.A. Caracterização química e testes de atividade biológica *in vitro* em abacaxizeiros silvestres. Dissertação (Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais). Bahia: Feira de Santana. 2016.

Darcie J.V., Lewis S.M. Practical Hematology. Churchill Livingstone. 5th ed. London. 1975.

De Carvalho L.A.L., Cruz N.R.N., Bueno P.J., Santana A.E. Avaliação eritrocitária através da biotecnologia de fluxo. Investigaçao. 2017;16(8):44-9.

Evangelista J.H., De Vera M.J., Garcia R.S., Joven M.G., Nerosa M.J.A., Solidum J.N. Preliminary Assessment of *in vitro* Anticoagulant Activity vs. Heparin 1,000I.U. and Cytotoxicity of Selected Philippine Medicinal Plants. IJCEE. 2012;3(6):371-6.

Franco L. Crescimento, produção e qualidade do abacaxizeiro 'Pérola' sob diferentes lâminas irrigação por gotejamento. Dissertação (Pós-graduação em produção vegetal no semiárido), Minas Gerais: Montes Claros. 2010.

Kaiser S., Pavel C., Gonzales Ortega, G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise muito variada. Rev. Bras. Farmacogn. 2010;20 (3):300-9.

Kerbauy G.B. Fisiologia vegetal. 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

Lopes Neto J.J., Veras K.S., Rosa C.S. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação de atividades biológicas do fruto de *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (Bromeliaceae). Gaia Scientia. 2015;9(1):164-71.

Manetti L.M., Delaporte R.H., Laverde Jr A.R. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. Quim. Nova. 2009;32(7):1885-97.

Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Plant. Med. 1982;45(5):31-4.

Offia-Oluan B.I., Ekwunife O.A. Production and evaluation of the physico-chemical and sensory qualities of mixed fruit leather and cakes produced from apple (*Musa pumila*), banana (*Musa sapientum*), pineapple (*Ananas comosus*). Niger Food J. 2015;33(1):22-8.

Parle M., Goel P. Is pineapple a fine apple?. Annals of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2010;1(2):134-41.

Peteros N.P., Uy M.M. Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Four Philippine Medicinal Plants. J Med Plants Res. 2010;4(5):407-14.

Pinto M.R. Utilização de materiais de origem vegetal em produtos farmacêuticos e cosmé-

ticos de aplicação cutânea. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Portugal: Lisboa. 2013.

Rodrigues H.G., Batista M.T.A., Fonseca L.C., Aversi-Ferreira T.A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotemas*. 2009;22(1):7-16.

Sant'ana V.A.C., Birgel E.H., Mourao G.B., Mirandola R.M.S. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo *Cienc Rural*. 2001;31(4):609-14.

Seyfried M. Triagem da atividade antitumoral de extratos vegetais utilizando ensaios de toxicidade *in vivo* sobre *Artemia salina* e *in vitro* sobre células da linhagem HeLa. Monografia (Pós-Graduação em Biologia Celular). Paraná: Curitiba. 2010.

Silva S., Tassara H. Abacaxi. In: Silva S, Tassara H, editors. *Frutas no Brasil*. São Paulo: Nobel, 2001. p.25-27.

Vieira D.A.P., Portes T.A., Stacciarini-Seraphin E., Teixeira J.B. Fluorescência e teores de clorofilas em abacaxizeiro cv. pérola submetido a diferentes concentrações de sulfato de amônio. *Rev Bras Frutic*. 2010;32(2):360-8.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra, desde el año 2007, el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través de SciELO Argentina.

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

Los artículos originales son trabajos de investigación completos y deben presentarse respetando las siguientes secciones: Introducción; Materiales y métodos; Resultados y Discusión (que pueden integrar una sección conjunta).

Los reportes de casos son descripciones de casos clínicos que por sus características signifiquen un aporte importante a la Toxicología.

Las comunicaciones breves son trabajos de menor extensión pero con connotación toxicológica novedosa y que signifiquen un aporte al campo toxicológico.

Las revisiones o actualizaciones comprenden trabajos en los cuales se ha realizado una amplia y completa revisión de un tema importante y/o de gran interés actual en los diferentes campos de la toxicología.

Los artículos de divulgación y artículos especiales son comentarios de diversos temas de interés toxicológico.

Las notas técnicas son descripciones breves de técnicas analíticas o dispositivos nuevos avalados por trabajos experimentales concluyentes.

Las imágenes en Toxicología pueden corresponder a imágenes relacionadas con la toxicología, desde lo artístico a los aspectos biológicos: plantas tóxicas, hongos tóxicos, animales venenosos, animales ponzoñosos, floraciones algales, químicos, alteraciones ambientales, casos clínicos, diagnóstico por imágenes (radiografía, electrocardiogramas, ecografías, angiografía, tomografía, resonancia magnética, microscopía óptica o electrónica, etc.).

El objetivo de la Sección Imágenes en Toxicología es la publicación de imágenes originales

(1-2 figuras de alta calidad) o clásicas interesantes o hallazgos inusuales que faciliten el diagnóstico clínico, de laboratorio o eco-epidemiológico de causas con origen toxicológico. Las imágenes pueden no ser excepcionales, pero sí ilustrativas.

El título debe ser corto y descriptivo. Si la imagen es una imagen clínica, el texto debería ser una descripción de la presentación del paciente seguida por puntos relevantes explicativos y el diagnóstico final. Las imágenes deberían incluir una leyenda descriptiva. Si la imagen corresponde a otros puntos de la toxicología, se debe incluir una breve descripción del contexto de la misma en el texto.

Por favor, utilice flechas o signos para identificar los puntos de interés en la imagen. En los casos clínicos remueva cualquier información de identificación del paciente.

El máximo de palabras recomendado es: resumen 200, texto 1000 y no más de 12 referencias.

Se aceptará un máximo de 3 autores por imagen.

En caso que la imagen no sea original, debe acompañarse de la autorización del propietario o de quien posea los derechos de la misma, lo que debe estar indicado en la nota que se presente al Comité Editorial de Acta Toxicológica Argentina.

Los resúmenes de tesis: son resúmenes ampliados que describen tesis de Maestría o Doctorales aprobadas. Estas deben incluir copia de la aprobación de la tesis con la declaración jurada del autor y su director. El texto no debe superar los 1000 caracteres.

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

Envío de manuscritos

El envío de manuscritos se realizará a través del Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) del Centro Argentino de Infor-

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

Gratuidad de las publicaciones

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

Derechos de autor

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

Derechos de publicación

Los autores retienen los derechos de publicación. Acta Toxicológica Argentina es una publicación de acceso abierto y posee una Licencia Pública de Creative Commons (CC-BY-NC). Los autores conservan los derechos de publicación y garantizan a la revista el derecho de ser el primer sitio de publicación del trabajo. Los autores retienen el derecho para publicar sus trabajos bajo las normas de la licencia CC de tipo BY-NC, "<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 pro-

cesador 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 tres a seis palabras clave, en el idioma correspondiente. Si el trabajo estuviese escrito en inglés, deberá tener un resumen en español. Las palabras clave iniciarán con mayúscula e irán separadas por punto y coma.

Introducción. Incluirá antecedentes actualizados acerca del tema en cuestión y los objetivos del trabajo definidos con claridad.

Materiales y métodos. Contendrá la descripción de los métodos, aparatos, reactivos y procedimientos utilizados, con el detalle suficiente para permitir la reproducción de los experimentos.

Consideraciones éticas. En todos los estudios clínicos se deberá especificar el nombre del Comité de Ética e Investigación que aprobó el estudio y que se contó con el consentimiento escrito de los pacientes. En todos los estudios con organismos no humanos, se deberán especificar los lineamientos éticos con respecto al manejo de los mismos durante la realización del trabajo.

Análisis estadístico. Se deberán informar las pruebas estadísticas con detalle suficiente como para que los datos puedan ser verificados por otros investigadores y fundamentar el empleo de cada una de ellas. Si se utilizó un programa estadístico para procesar los datos, éste deberá ser mencionado en esta sección.

Resultados. Se presentarán a través de una de las siguientes formas: en el texto, o mediante tabla/s y/o figura/s. Se evitarán repeticiones y se destacarán sólo los datos importantes. Se

dejará para la sección Discusión la interpretación más extensa.

Las **tablas** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán los bordes de las columnas. Asegúrese que cada tabla sea citada en el texto. Las **figuras** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los gráficos de barras, tortas o estadísticas deberán tener formato GIF. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán ser incluidas en el texto de la leyenda.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplos:

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

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

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

Ejemplos:

1. **Artículo estándar en publicación periódica**
Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid

-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-287.

2. **Libros y monografías**

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

3. **Capítulo de libro**

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

4. **Material electrónico**

a. Artículo en publicación periódica en internet

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

B. Página en internet

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

c. Parte de una página de internet

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

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

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 100 words, text 1000 words. The number of references should not be over 12.

No more than three authors may be listed.

If the image is not original, the authorization of the author or whom poses the copyright must be added in the presentation letter to be presented to the Editorial Committee of *Acta Toxicológica Argentina*.

Thesis summaries are sufficiently detailed abstracts of approved doctoral or magisterial thesis. They must include a copy of acceptance and a sworn statement by the author and director, and should not exceed 1,000 characters.

Articles can be submitted to *Acta Toxicológica Argentina* (henceforth *Acta*) in Spanish, Portuguese or English. All submissions will be evaluated by at least two independent reviewers, selected by the editors. The Editorial board will base its decision to reject, accept with changes or accept for publication the submitted article on these reviews. The identity of authors and reviewers will not be disclosed throughout this process.

Submission of manuscripts

Submission of manuscripts will be made through the Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) of the Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT). Instructions for authors will be found at the *Acta-PPCT-CAICYT* web page <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata>

Free publishing costs

The submission, reviewing, editing and publishing of any kind of scientific or technical material or of any disclosure material accepted by

Acta 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 a 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 <http://creativecommons.org/licenses/bync/2.5/ar/>". They can freely share their work (recognizing its initial publication in this journal) with the sole exception of reproduction of the work published for commercial purposes, according to this kind of CC license.

General guidelines in the preparation of manuscripts for original articles

Articles must be written using a word processor (Microsoft Word 2003 or higher) with double-spacing throughout (including abstract, references and tables), and a minimum letter size of Arial 12. Manuscripts must contain page numbers on each page from the first page. The use of bold and italic letters must be limited to the bare minimum necessary.

First page should contain the article title, full name and affiliations of all authors, workplace (name of institution and postal address; if it differs between authors, numerical superscripts, not in parentheses, next to each author should be used to identify it); fax and/or e-mail address of the corresponding author (signaled by a subscript asterisk next to the name).

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submis-

sion and in English, each followed by three to six keywords 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 resolu-

tion 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 <http://creativecommons.org/licenses/bync/2.5/ar/> 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 **italico** 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 três a seis palavras-chave, no idioma correspondente. Se o trabalho estiver escrito em inglês, deverá apresentar um resumo em espanhol. As palavras-chave devem começar com letra maiúscula e estar separadas por ponto-e-vírgula.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

espécie em itálico.

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

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

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

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

Exemplos:

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

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

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

Exemplos:

1. Artigo padrão em publicação periódica

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

2. Livros e monografias

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

3. Capítulo de livro

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

4. Material eletrônico

a. Artigo em publicação periódica em internet

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

b. Página de internet

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

c. Parte de uma página de internet

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

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