

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 27
N° 2
Septiembre 2019

Acta Toxicológica Argentina es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina.

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

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

Se encuentra indexada en los siguientes directorios

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



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión directiva

Presidente

Mirtha M. Nassetta

Vicepresidente

Ricardo A. Fernández

Tesorera

Mirta Ryczel

Secretaria

Julieta S. Borello

Vocales

Fernanda Simoniello

Jorge Zavatti

Patricia Lucero

Vocales suplentes

Ana Irene Cañas

Augusto Piazza

Noemí Reartes

Comité científico

Aldo Sergio Saracco

Silvia Cristina Cortese

María Graciela Bovi Mitre

Gerardo Daniel Castro

Adriana Silvia Ridolfi

Órgano de fiscalización

Daniel González

Patricia Quiroga

Adriana Piñeiro

Tribunal de honor

José A. Castro

Edda C. Villaamil Lepori

Elda Cargnel

Acta Toxicológica Argentina

Director

Adolfo R. de Roodt, *Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Ministerio de Salud; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Comité de redacción

Ricardo A. Fernández, *Hospital Infantil Municipal, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba.*

Susana I. García, *Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Ministerio de Salud de la Nación; Dirección de Salud y Educación Ambiental Autoridad de la Cuenca Matanza Riachuelo.*

Valentina Olmos, *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Adriana S. Ridolfi, *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Aldo S. Saracco, *Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Mendoza; Ministerio de Salud del Gobierno de Mendoza, Mendoza.*

Comité de apoyo

Julieta Borello, *Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba, Córdoba.*

Patricia Lucero, *Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba, Córdoba.*

Vanessa Oliveira, *Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Patricia N. Quiroga, *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Edda C. Villaamil Lepori, *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Comité editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

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

José A. Castro, *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina*

Elizabeth de Souza Nascimento, *Universidade de Sao Paulo, Brasil*

Jean-Philippe Chippaux, *Institut de Recherche pour le Développement; Institut Pasteur de Paris, Francia.*

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

Heraldo Nelson Donnenwald, *Universidad Favaloro, Argentina.*

Gina E. D'Suze García, *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela*

Ana María A. Ferrer Dufol, *Universidad de Zaragoza, España.*

Veniero Gambaro, *Università di Milano, Italia.*

Carmen Jurado, *Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses de Sevilla, España.*

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

María A. Martínez Caballero, *Universidad Complutense de Madrid, España.*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

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

Bernardo Rafael Moya, *Centro de Información en Medicamentos y Toxicología, Angola.*

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

Haydée N. Pizarro, *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina*

Andrea S. Randi, *Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

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

María M. Salseduc, *Academia de Farmacia y Bioquímica, Argentina*

Carlos Sèvcik, *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela*

Francisco O. de Siqueira França, *Universidad de Sao Paulo, Brasil.*

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

Norma Vallejo, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Eugenio Vilanova Gisbert, *Universidad Miguel Hernández, España*

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

Eduardo N. Zerba, *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina*

INDICE
(CONTENTS)

Artículos originales

Preclinical studies of hydroalcoholic extract of *Calea uniflora* Less
Cardoso, Paula Da Silva; Pagnan, Renato; Freitas, Michele Daros; Ramos, Luan de Souza; Amaral, Patricia de Aguiar; DalBó, Silvia 49

Reporte de casos

Intoxicación con rodenticidas anticoagulantes: serie de casos y revisión de literatura
Lugo, Marcos F. 60

Mordedura de *Phalotris lemniscatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (Squamata, Dipsadidae) en Uruguay
Negrin, Alba; Morais, Víctor; Carreira, Santiago; Tortorella, María Noel 65

Comunicaciones breves

Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar
Rubio N.C; Moreda-Piñeiro A.; Bermejo-Barrera P.; Bermejo A.M 72

Instrucciones para los autores 81

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

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

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

ARTÍCULOS ORIGINALES

Preclinical studies of hydroalcoholic extract of *Calea uniflora* Less Estudios preclínicos de extracto hidroalcohólico de *Calea uniflora* Less

Cardoso, Paula Da Silva; Pagnan, Renato; Freitas, Michele Daros; Ramos, Luan de Souza; Amaral, Patrícia de Aguiar; DalBó, Silvia

Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais. Laboratório de Plantas Mediciniais. Avenida Universitária 110, CEP: 88806-000, Criciúma, Santa Catarina, Brazil. Tel: +55 48 34312535.

Received: November 19th, 2018

Accepted: March 27th, 2019

Abstract. *Calea uniflora* Less known popularly as Arnica in Brazil, is a native plant from Brazil, popular used by coastal populations from south of Santa Catarina. The purpose of this study was to verify the safety profile in of hydroalcoholic extract of *C. uniflora* in florescences. The hydroalcoholic extract of *C. uniflora* in florescences was evaluated for its acute and sub-acute toxicity. Acute topical toxicity was performed using the methodology of guideline 402 from OECD. Acute oral toxicity was performed using the methodology of guideline 423 from OECD and sub-acute toxicity was performed using the methodology adapted of guideline 407 from OECD. The single dose for oral or topical administration of *C. uniflora* showed $DL_{50} > 5000$ mg/kg b.w. The sub-acute treatment induced animal death in groups, which was administered extract in the doses 100, 250, 500 and 1000 mg/kg. The main signs of toxicity observed were respiratory difficulty, increase in lung weigh, lung damage and muscular relation. The topical or oral administration of *C. uniflora* extract in short period did not caused toxicological effects in animals, however, when administered for a longer period and in concentrations of 250, 500 and 1000 mg/kg (oral,) caused lung damage and even the death of the animal.

Keywords: Arnica; Inflorescences; Medicinal plant; *Calea uniflora*

Resumen. *Calea uniflora* Less conocida popularmente como Arnica en Brasil, es una planta nativa de Brasil, popularmente utilizada por poblaciones costeras del sur de Santa Catarina. El objetivo de este estudio fue verificar el perfil de seguridad del extracto hidroalcohólico de inflorescencias de *C. uniflora*. El extracto hidroalcohólico de inflorescencias de *C. uniflora* fue evaluado en cuanto a su toxicidad aguda y subaguda. La toxicidad tópica aguda se realizó utilizando la metodología de la directriz 402 de la OECD. La toxicidad oral aguda fue realizada usando la metodología de la directriz 423 de la OECD y la toxicidad subaguda fue realizada usando la metodología adaptada de la directriz 407 de la OECD. La dosis única para administración oral o tópica de *C. uniflora* mostró $DL_{50} > 5000$ mg/kg. El tratamiento subagudo indujo la muerte de animales en grupos a los que se administró extracto en las dosis de 100, 250, 500 y 1000 mg/kg. Los principales signos de toxicidad observados fueron dificultad respiratoria, aumento del peso del pulmón, daño pulmonar y relación muscular. La administración tópica oral del extracto de *C. uniflora* a corto plazo no causó efectos toxicológicos en los animales, mientras que, cuando se administró por un período mayor y en las concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/kg (oral) causaron daños en los pulmones y hasta la muerte del animal.

Palabras clave: Arnica; Inflorescencias; Planta medicinal; *Calea uniflora*

Introduction

The Astereceae family presents some plants that have a toxic effect such as *Solidago microglossa* (Neto *et al.* 2004) and *Lychnophoratricho carpha* (Ferrari *et al.* 2012). In this family we found the genus *Calea* that occurs in both, tropical and subtropical regions of the world, and contains about 110 species (Pruski and Urbatsch 1988, Amaral *et al.* 2017). Plants of *Calea* genus are rich in components such as lactones, sesquiterpenes (Ober *et al.* 1987) and derivatives of p-hydroxyacetophenone (Bohlmann *et al.* 1981). Besides, some species of *Calea* have scientific studies such as *C. Hymenolepis* (Bohlmann *et*

al. 1982), *C. pruivifolia* (Castro *et al.* 1989) and *C. leptcephala* (Ober *et al.* 1986) about terpene identification; as also biological activity of *C. urticifolia* (Torres-Rodríguez *et al.* 2016) and *C. clematidea* (Ferraz *et al.* 2009). Extract of aerial parts *C. clematidea* did not induce DNA damage in brain tissue from treated animals in doses 100 and 150 mg/kg/ip (*in vivo*), assessed by comet assay (Ferraz *et al.* 2009). Extract from the leaves of *C. urticifolia* has anti-inflammatory and antioxidant activity *in vitro* test, RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (Torres-Rodríguez *et al.* 2016).

In the southern Brazil, *Calea uniflora* L. is known as a medicinal plant, popularly called Arnica (Hanazakiet al. 2012). *C. uniflora* is heliophytic and develops in a subtropical climate. This species is native to Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. In Brazil, it is found in the center-south in Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Flora do Brasil 2014). In particular, the plant is well distributed in the south of Santa Catarina in the coastal area in well-drained soil regions, where usually is collected by the local population and neighboring municipalities.

C. uniflora is morphologically similar to *Arnica montana*, European plant, used popularly as anti-inflammatory. In the years 1820-1830 this plant appeared in various European pharmacopoeias. There are records of therapeutic use of *A. montana* (Asteraceae) in Portugal, as in the Island of the Azores and Madeira (Rivera et al. 2010; Obón et al. 2012). The colonization of the Brazilian South by Europeans may have provided this comparison of species and thus the popular name of *C. uniflora* have emerged, as well as its mode of preparation and therapeutic use. According to Ramos et al. (2016), 65.4% of the people who use *C. uniflora* have known the plant since childhood and 84.6% have obtained knowledge about the plant through their relatives. Some studies with *C. uniflora* have presented significant results as leishmanicidal (Do Nascimento et al. 2007), antifungal, trypanocidal activity (Do Nascimento and De Oliveira 2004), antinociceptive activity (Rodrigues-Torres et al. 2016) and anti-inflammatory activity (Da Rosa et al. 2017). Phytochemical studies with *C. uniflora* identified many compounds for example, 2,2-dimethyl-6-(1-hydroxyethyl)-chroman-4-one, uniflorol-A, uniflorol-B (Do Nascimento et al. 2007), 2-senecioid-4-(hydroxyethyl)-phenol, 2-senecioid-4-(angeloyloxyethyl)-phenol, 2-senecioid-4-(methoxyethyl)-phenol and 2-senecioid-4-(pentadecanoyloxyethyl)-phenol (Do Nascimento et al. 2002).

According to local knowledge, this plant is widely used for wound healing, muscle pain, bruises/hematomas, flu/cold and insect bites. The part of the plant most used is the inflorescences prepared mainly by maceration in hydroalcoholic solution, used topically and orally (Ramos et al. 2016).

Some biological activities of *C. uniflora* are already known, but little is known about their toxicological effects. Knowing the toxicity of several plants of the family Asteraceae, the purpose

of this study was to verify the safety profile of the hydroalcoholic extract of *C. uniflora* inflorescences through the acute and sub-acute extract administration in rodents.

Materials and methods

Plant material and extraction

Inflorescences of *C. uniflora* were collected in January/February 2017 in Balneário Rincão (Santa Catarina), located in the southern Brazil (28°48'20.0"S and 49°14'45.3"W). The plant was identified and authenticated by Dr. Vanilde Citadini-Zanette and Dr. Mara Rejane Ritter, and a voucher specimen (dry plant species fixed on white paper with its botanical data, stored in a closed cabinet at temperature 18-23 °C with humidity 40-55 %) was deposited in the Herbarium of Dr. Raulino Reitz (CRI) of the University of the Extremo Sul Catarinense (UNESC-SC), Brazil, CRI 10304.

The material plant was dried in a drying oven at approximately 50–60 °C. Briefly, material plant was extracted with ethanol (70%) during fifteen days with occasional stirring, followed by the filtration and evaporated to dryness under reduced pressure. The inflorescences extract of *C. uniflora* (ECU) was kept at 4-8 °C, dissolved in distilled water/corn oil/tween 80 prior to administration oral and dissolved in acetone prior to administration topical.

Total flavonoid content was estimated by a colorimetric method using aluminium chloride. ECU (2 mg/ml) was mixed with 1.5 mL methanol, 0.1 mL of potassium acetate 1M and 2.8 mL of water, mixed and allowed to stand for 3 min, and 0.1 mL 10% aluminium chloride solution was added. The absorbance at 415 nm was measured after 30 min, in triplicate. Quercetin was used as standard to construct a calibration curve (12.5–200 µg/mL). Total flavonoid content was expressed µg/ml quercetin equivalents (Chang et al. 2002).

Animals

Young adult male and female *Wistar* rats (a total of 118 animals, 50 male and 68 female, 8 to 10 weeks old, weight 200-300 g) were supplied by vivarium of the University of the Extremo Sul Catarinense (UNESC). Animals were segregated according to the genus and housed in plastic cages with access to food and water *ad libitum*, under a 12 h light/dark cycle at a constant temperature of 21 ± 2 °C. Animals were handled and experiments carried out in conformity with the European Union on Animal

Care (CEE 86/609). The experimental protocol was approved by the local ethics committee (CEUA UNESC), registered with protocol No. 050/2014. The animals were randomly selected, marked to permit individual identification, and kept in their cages for at least 5 days prior to dosing to allow for acclimatization to the laboratory conditions. In the acute topical test, a total of 6 female animals were used, 3 in the control group and 3 in the 2000 mg/kg ECU group. In the acute oral test, 12 female animals were used, 6 in the control group and 6 in the 2000 mg/kg ECU group. The doses for the acute tests were established by the diagram of guides 402 and 423 (OECD) starting at the 2000 mg/kg. In the sub-acute 100 rats were allocated in five groups (1 control group and 4 ECU groups) of 20 animals each (10 males and 10 female). Rats received ECU in doses 100, 250, 500 or 1000 mg/kg (oral.) by gavage. Doses for sub-acute tests were established by the recommendations of the guide 407 (OECD) and based on the doses used in the antinociceptive test of the inflorescence extract of *C. uniflora* (Rodrigues-Torres *et al.* 2016).

Acute topical toxicity

The analysis was performed using the methodology of guideline 402 from Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 2017), starting dose of 2000 mg/kg of *C. uniflora* extract applied topically in female rats, exposed area of dorsal/flank skin (10% of the total body surface area). For this, it was necessary to removed all fur, 24 hours before the application of the ECU or vehicle.

The test started with 2 animals (1 animal from control group and 1 animal from ECU group), after the test according to the diagram of guide 402 with administration in 4 other animals (2 animals from control group and 2 animals from ECU group), the dose depended on the signs of toxicity. After application, the treatment was in contact with the skin for 24 hours, the animals were observed for 24 hours after application and for 14 days were observed daily for 1 hour. The same test was performed using only extract diluents (acetone). Acetone was chosen as the diluent because it is a very volatile solvent, with only the extract remaining in the application area. The skin was removed and fixed in 10% formalin, embedded in paraffin. Then the skin was sectioned and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination (Lameb 2017).

Acute oral toxicity

The analysis was performed using the methodology of guideline 423 from Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 2001), starting dose of 2000 mg/kg (oral) of *C. uniflora* extract in female rats, administered in single dose *in bolus* by gavage. The same test was performed using only extract diluents (water/corn oil/tween 80).

The test started with 6 animals (3 animals from control group and 3 animals from ECU group), after the test according to the diagram of guide 423 with administration in 6 other animals (3 animals from control group and 3 animals from ECU group), the dose depended on the signs of toxicity. After administration of treatment, the animals were observed for 24 hours, and for 14 days were observed daily for 1 hour.

Sub-acute oral toxicity

The analysis was performed using the methodology adapted of guideline 407 from Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 2008). *C. uniflora* extract (100, 250, 500 or 1000 mg/kg/oral.) was administered daily for 30 days. Control group received the same amounts of the vehicle (water/corn oil/tween 80). Food and water consumption were measured daily, and the body weight was measured every five days. During the experimental period, all animals were evaluated in order to observe any signs of toxicity daily. Behavioral analysis was performed on the 15th day and 30th day of treatment. The behavioral analyses were performed according to the tests: open-field test (Vianna *et al.* 2000); elevated plus-maze (Pellow *et al.* 1985); forced swimming (Detke *et al.* 1995) and rota-rod (Paul *et al.* 1994).

At the end of treatment period, blood samples were collected for hematological and biochemical parameters analysis. The heart, liver, kidney and lung were dissected and weighed. The results of organs weight were expressed as relative corporal weight (organ weight g/100g body weight).

One part of the blood sample was collected by cardiac puncture in heparin tubes for hematological analysis and the other in dry tubes for separation of serum to biochemical analysis. Blood samples in dry tubes were centrifuged at 3500 rpm (15 min) and the serum was collected and introduced into new tubes. Triglycerides, total cholesterol (TC), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), glucose, uric acid, alkaline phosphatase, urea, creatinine and total proteins were measured according to

commercial kits obtained from Analisa® (Minas Gerais, Brazil) by spectrophotometry (Femto 700). Red blood cells (RBC), white blood cells (WBC) and platelet were analyzed in the Neubauer chamber.

After animals sacrificed by deep anesthesia (Ketamine 80 mg/kg and xylazine 20 mg/kg), and then the heart, liver, lung and kidney were removed and fixed in 10% formalin, embedded in paraffin. The organs and tissues were then sectioned and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination.

Statistical analysis

The results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or median with range. In parametric analyses, comparison between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett. The *p < 0.05 or **p < 0.01 was considered statistically significant.

Results

The total flavonoid contents of the samples were determined and expressed in terms of quercetin (standard curve equation: $y = 0.009x + 0.100$, $R^2 = 0.994$), content in the ECU 92.763 µg/ml quercetin equivalents.

The toxicological tests started with application of 2000 mg/kg/topical of ECU in one animal and then the test was repeated with more two animals. The single administration of ECU caused no mortality. The control group and ECU group did not present signs of toxicity. The results

show that the ECU has category 5 in GHS (Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures) classification or $LD_{50} > 5000$ mg/kg/b.w/ topical. Histological analyzes did not show any morphological alteration of skin.

The oral test started with administration acute of 2000 mg/kg/ oral of ECU in three animals and then the test was repeated with more three animals. The single administration caused no mortality. However, one hour after administration of ECU was observed piloerection and agitation signals. The control group did not present signs of toxicity. Toxicity signs were registered in animal throughout the observation period (14 days). The results show that the ECU has $LD_{50} > 5000$ mg/kg/b.w or category 5 in GHS classification.

In sub-acute evaluation, the animals present toxicity signs in all groups that received ECU (100, 250, 500 or 1000 mg/kg/oral) as: piloerection, cough signals, respiratory difficulty, nose bleeding, suggestive behavior pain, diarrhea and sedation. These behaviors signs were observed in all groups treated with ECU, however the dose of 100 mg/kg the signs were less frequent. In the control group these effects were not observed. However, 30 deaths have occurred during sub-chronic treatment (Figure 1), therefore male group of 1000 mg/kg was not analyzed in tests: relative weight of organs, biochemical parameters, hematological parameters and behavioral test (open-field, elevated plus-maze, forced swimming and rota-rod).

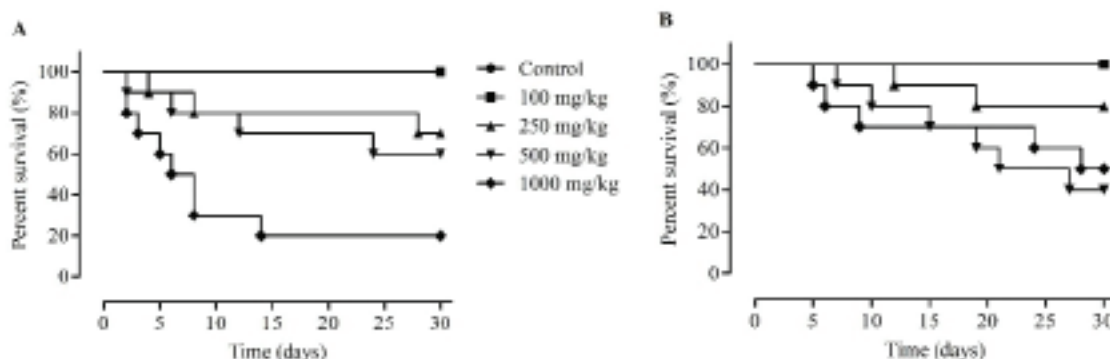


Figure 1. The effect of ECU on rat's survival in male (A) and female (B). Animal were treated during 30 days with ECU (100 – 1000 mg/kg/day, oral). Control group receives the same amount of vehicle Results were expressed as per cent survival and are representative of one experiment (n = 10 per group). The 100 mg/kg group line overlaps the control group.

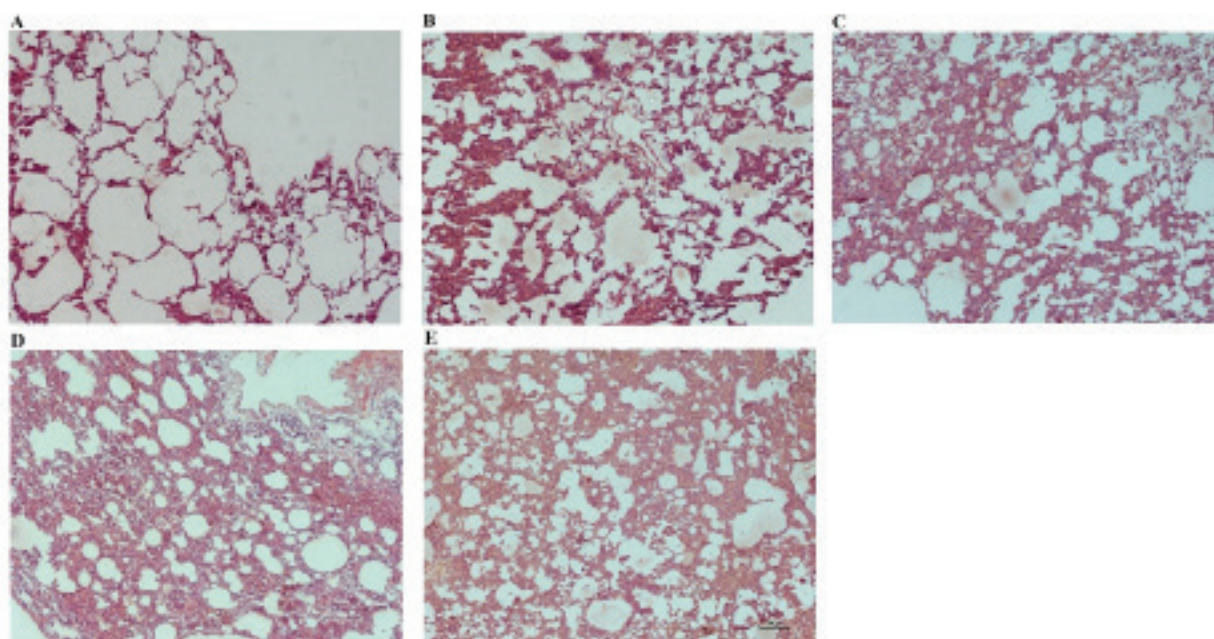


Figure 2. Representative microphotograph of the lung at 100x, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. (A) control. (B) 100 mg/kg/day p.o of ECU. (C) 250 mg/kg/day p.o of ECU. (D) 500 mg/kg/day p.o of ECU. (E) 1000 mg/kg/day p.o of ECU.

Table 1. Effect of the sub-acute oral administration of different dose ECU on relative weight of organs (g/100g body weight) in male *Wistar* rats.

	Control	ECU mg/kg		
		100	250	500
Liver	3.512±0.093	3.508±0.135	3.920±0.244	3.655±0.342
Heart	0.428±0.022	0.420±0.017	0.444±0.035	0.438±0.043
Left kidney	0.458±0.013	0.439±0.020	0.494±0.041	0.476±0.030
Right kidney	0.461±0.009	0.473±0.021	0.491±0.040	0.445±0.033
Lung	0.664±0.055	0.916±0.049*	0.834±0.095	0.866±0.095

Data are expressed as mean weight of organs \pm SEM of 6 to 10 animals per group. The animals of 1000 mg/kg group were not present in this table due to high mortality. The statistical analyze was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. *Significance against control group: $p \leq 0.05$. **Significance against control group: $p \leq 0.01$.

Table 2. Effect of the sub-acute oral administration of different dose ECU on relative weight of organs (g/100g body weight) in female *Wistar* rats.

	Control	ECU mg/kg			
		100	250	500	1000
Liver	3.622±0.226	3.60±0.105	4.059±0.212	3.817±0.376	4.076±0.252
Heart	0.511±0.021	0.509±0.028	0.449±0.076	0.457±0.038	0.538±0.048
Left kidney	0.504±0.034	0.479±0.021	0.590±0.074	0.521±0.011	0.465±0.014
Right kidney	0.519±0.030	0.491±0.017	0.543±0.032	0.516±0.001	0.516±0.001
Lung	0.744 ±0.043	0.844 ±0.055	0.968±0.059	0.769±0.044	1.575±0.396***

Data are expressed as mean weight of organs \pm SEM of 4 to 10 animals per group. The statistical analyze was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. *Significance against control group: $p \leq 0.05$. **Significance against control group: $p \leq 0.01$. ***Significance against control group: $p \leq 0.001$.

The relative organ's weight (g/100g body weight) of male and female rats treated with ECU for 30 days are shown in *table 01* and *02*. In this analysis was possible to observe an increase of lung organ in groups with ECU (100 and 1000 mg/kg/oral). Histological analyzes showed lung damage characterized by neutrophil infiltration (*Figure 2*) in dose 100, 250 500, 1000 mg/kg/oral, which may be related to increase lungs weight. The other organs did not show any morphological alteration in the analyzed tissues.

Some behavioral changes observed in the oral acute test were noted in oral sub-acute test, however with more frequency. Other possible signs of toxicity also emerged with effect suggestive of pain and respiratory difficulty; this behavior was observed in all groups treated with ECU. Besides, during the sub-acute experiment 30 deaths occurs in groups treated at the doses of 250, 500 and 1000 mg/kg/day (in both, male and female).

The female group shows a decrease in body weight at the dose 1000 mg/kg. However, there was reduction in consumption diet also. Water and food consumption and body weight evolution are summarized in *Figure 3*. When the animals were treated with ECU, it was observed skeletal muscle relation in rota-rod test at doses 100 and 250 mg/kg/oral in 15 days treatments and 250 mg/kg/oral in 30 days, showed *Figure 4*. In the elevated plus-maze test were analyzed the parameters: open arm entries, closed arm entries, open arm entries attempts, closed arm entries attempts, frequency of defecation, time

open arm and time closed arm; however no significant difference was observed between the control and treatment groups in any of the parameters. In the forced swimming, all groups' animals swam the time required. In open field test, the parameters: crossing number, rearing number, frequency of defecation, stationary time, center of the field time and edge of field time were analyzed, however no significant difference was observed between the control and treatment groups.

Biochemical analysis as well most parameters remained unchanged, as only non-significant variations were observed. In hematological parameters, no significant difference occurs between the control and treated groups with ECU.

Discussion

C. uniflora, a medicinal plant used in southern Brazil (Ramos *et al.* 2016), has few studies about the toxicity *in vivo*. However, report the potential therapeutic effect of *C. uniflora* extracts as anti-fungal, trypanocidal and lechimanicidal (Do Nascimento *et al.* 2004, Do Nascimento *et al.* 2007). Test *in vitro* with extract hydroalcoholic from *C. uniflora* did not show a high degree of cytotoxicity compared to controls doxorubicin and vincristine for B16-F1 and HaCaT cell lines, but dichloromethane fraction has significant inhibition in the two cell cells compared to controls (Rodrigues-Torres *et al.* 2016). Known the biological effect of *C. uniflora*, this study evaluated the acute and sub-acute toxicological profile of the ECU in rats by oral and topical administration *in vivo*.

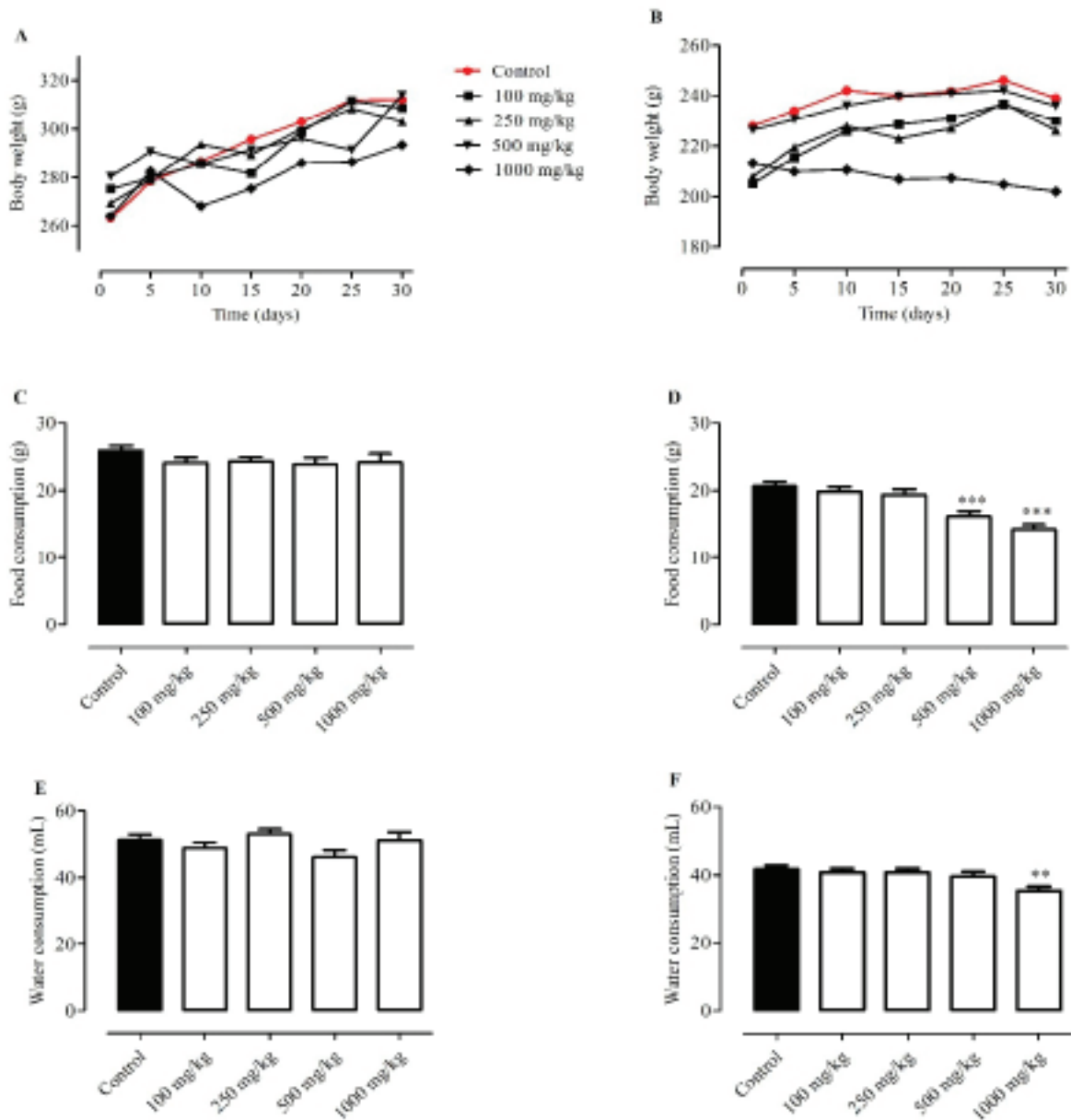


Figure 3. In panel A and B were presented body weight evaluation of males (A) and female (B) rats. In Panel C and D are represented mean food consumption daily of males (C) and female (D). In panel E and F was shown mean daily water consumption of males (E) and female (F). *Wistar* rats were submitted to 30 days treatments with ECU (100 – 1000 mg/kg/day, oral.). Each point represents the mean \pm SEM of 2 to 10 animals per group. The statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. **Significance against control group: $p \leq 0.01$; ***Significance against control group: $p \leq 0.001$.

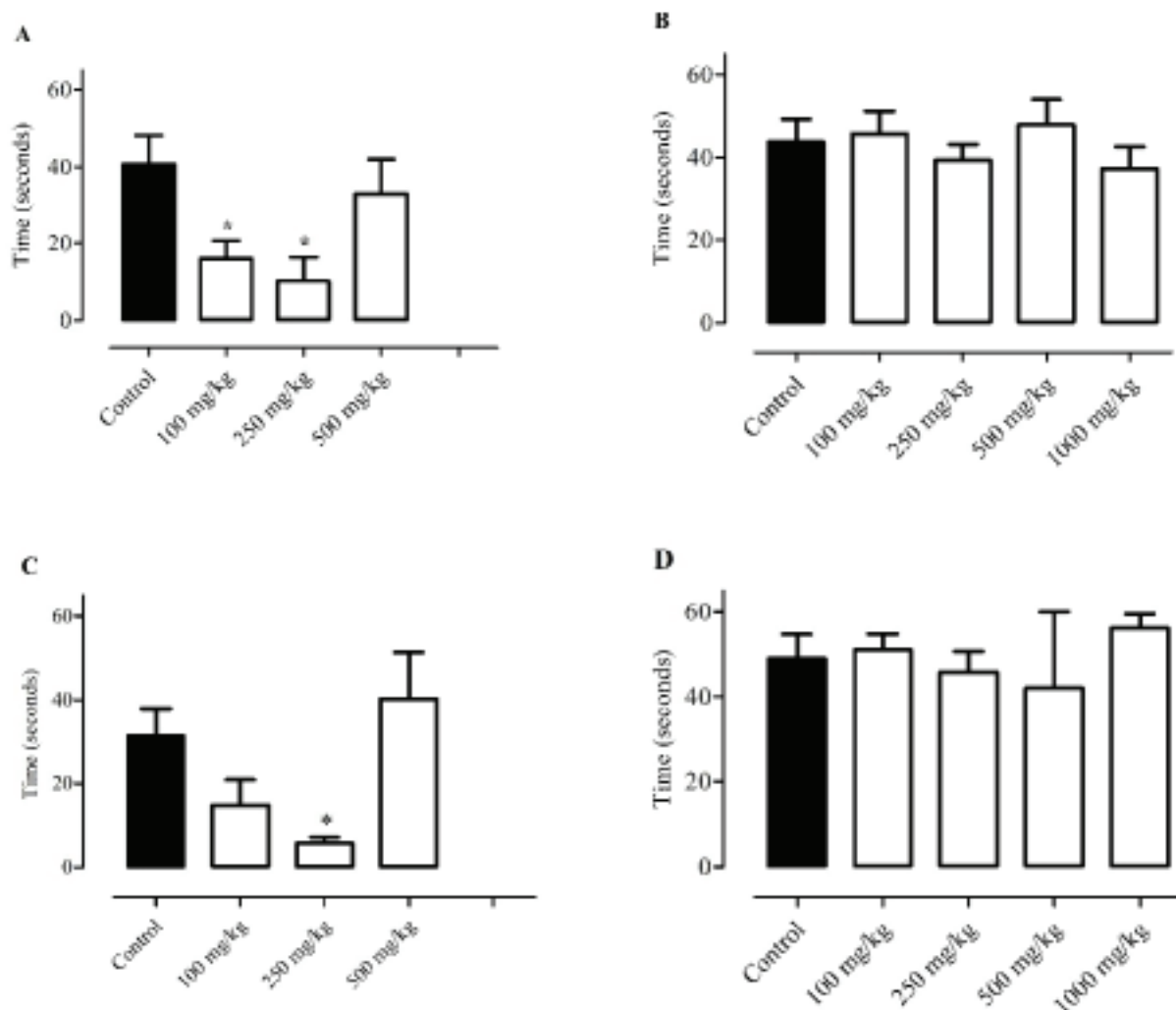


Figure 4. Effect of ECU in motor coordination evaluated in Rota-test in male (A and C) and female (B and D) rats that received ECU (100 – 1000 mg/kg/day, oral.) about 15 days (A and B) and 30 days treatment (C and D). Data are expressed as mean \pm SEM of 4 to 10 animals per group. The statistical analyzes was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. *Significance against control group: $p \leq 0.05$.

In the topical and oral acute test were observed toxicity of the ECU at 2000 mg/kg, since the extract did not induce mortality in all experimental period. This result contributes with previous studies of *C. uniflora* and *C. clematidea*, which demonstrate that the methanol extract at the doses of 100 and 150 mg/kg/ i.p, did not caused anxiolytic, muscular relaxing and genotoxic effects (Ferraz *et al.* 2009). Some behavioral alterations were observed in first hour after administration of the ECU in acute test, such as piloerection and agitation signals. These behavioral effects were not observed in the control group. Although the presence of this signs of toxicity,

these were not observed with high frequency and extract did not induce mortality of animals.

The extract (ECU) content 92.763 μ g/ml quercetin equivalents, flavonoids as orobol and quercetin 3-O-glucopyranosyl were identified in the extract from *C. uniflora* leaves, and phenolic compounds as noreugenin, ethyl caffeate, butein, *p*-hydroxy-butein, caffeic acid, butein 4-O-glucopyranosyl and 3,5-di-O-caffeoylquinic acid (Lima *et al.* 2016).

C. uniflora have identified substances derived of *p*-hydroxyacetophenone with the chromanones Uniflorol A and Uniflorol B (Do Nascimento *et al.* 2007). This is important since some chromenes

have the ability to inhibit determined enzymes such as: acetylcholinesterase (Anand and Singh 2013), cyclin-dependent kinase (Lee *et al.* 2007) e alkaline phosphatase (Al-Rashida *et al.* 2013). The inhibition of these enzymes may be a toxicity mechanism of some plants of this family. In accordance to that, some studies evince that Asteraceae plants inhibit the enzyme acetylcholinesterase (Gurovic *et al.* 2010). Study with *Calea serrate* proved that extract rich in chromenes obtained from leaves and stalk inhibited of acetylcholinesterase enzyme of brain structures (frontal cortex, striatum and hippocampus) in *Wistar* rats (Ribeiro *et al.* 2012); two chromenes were isolated from this plant, being precocene and eupaloriochromene (Steinbeck *et al.* 1997). Other plants of family Asteraceae such as *Inulagraveolens*, *Artemisia dracuncululus*, *Eupatorium odoratum* and *Arnica chamissonis* also present inhibitory activity of the acetylcholinesterase enzyme (Bhadra *et al.* 2015). The skeletal muscle relation showed *Figure 4* can reflect an over stimulation of cholinergic system. When acetyl cholinesterase is inhibited at the neuromuscular junction (skeletal muscle), occurs an increased acetylcholine concentration at the synaptic cleft, and the frequency of stimuli on nicotinic receptors occurs. This prolonging stimuli cause a blocking depolarization at neuromuscular transmission (Hibbs and Zambon 2012).

During the sub-acute experiment 30 deaths occurs in groups treated at the doses of 250, 500 and 1000 mg/kg/day, the most relevant behavior observed before death was respiratory difficulty, suggesting a possible extract action in the respiratory systems or in the nervous central system. Another result that collaborates with this hypothesis is the lungs weight that had a significant increase in some groups treated with ECU compared to the control group and lung damage characterized by neutrophil infiltration in dose 100, 250, 500, 1000 mg/kg/oral.

Conclusion

Experimental results show that the ECU administered in topical and oral acute treatment has no toxic effects, with $LD_{50} > 5000$ mg/kg (b.w.). However, prolonged use oral of the extract at doses 250, 500 and 1000 mg/kg/oral (b.w) is toxic and cause death of the animal. The signs of toxicity observed were respiratory difficulty, increase in lung weigh, lung damage and muscular relation of ECU group of 100, 250, 500, 1000 mg/kg/oral. This plant is popularly used

topically and orally, and the results of this study show important information about the safety of *C. uniflora* use. Oral or topical (single dose) acute use did not cause toxicity, however, repeated oral use caused low dose toxicity (100 mg / kg).

Acknowledgments: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC). We also thank Patrick Luiz Amboni Canela for histological analysis and Dr. James Barlow (RCSI) for a critical lecture.

References

- Al-Rashida M., Raza R., Abbas G., Shah M.S., Kostakis G.E., Lecka J., Sevigny J., Mudassar M., Papatriantafyllopoulou C., Iqbal J. Identification of novel chromone based sulfonamides as highly potent and selective inhibitors of alkaline phosphatases. *Eur J Med Chem.* 2013;66:438–449.
- Amaral P.A., Costa F.V., Antunes A.R., Kautz J., Citadine-Zanette V., Dévéra T.F.L.L., Barlow J., Dalbó S. The genus *Calea* L.: A review of isolated compounds and biological activities. *J Med Plants Res.* 2017;11(33):518–537.
- Anand P., Singh B. Synthesis and Evaluation of Substituted 4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl Phenyl Carbamates as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors and Anti-Amnesic Agents. *Med Chem.* 2013;9(5):694–702.
- Bhadra S., Dalai M.K., Chanda J., Mukherjee P.K. Evaluation of Bioactive Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors from Medicinal Plants. In: Mukherjee P.K Editors. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine. Elsevier Inc; 2015.p.273-306.
- Bohlmann F., Mathur R., Jakupovic J., Gupta R.K., King R.M., Robinson H. Furano heliantholides and other compounds from *Calea hymenolepis*. *Phytochemistry.* 1982;21(8):2045–2048.
- Bohlmann F., Zderot C., Kings R.M., Robinson H., Juni S., Berlin D., Germany W. Derivatives from *Calea* species * The aerial parts of the new *Calea* species afforded Part 343 in the series Naturally Occurring Terpene. *Phytochemistry.* 1981;20(7):1643–1647.
- Castro V., Tamayo-Castillo G., Jakupovic J. Sesquiterpene lactones and other constituents from

- Calea prunifolia* and *C. Peckii*. Phytochemistry. 1989;28(9):2415–2418.
- Chang C; Yang M.; Wen H.; Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 2002;10(3):178-182.
- Da Rosa J.S., De Mello S.V.G.V., Vicente G., Moon Y.J.K., Dalto F.P., Lima T.C., De Jesus Souza R., Biavatti M.W., Frde T.S. *Calea uniflora* Less. Attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. Int. Immunopharmacol. 2017;42:139–149.
- Detke M.J., Rickels M., Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacology (Berl). 1995;121(1):66–72.
- Do Nascimento A.M., Costa F.C., Thiemann O.H., De Oliveira D.C.R. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. Zeitschrift fur Naturforsch Sect C J Biosci. 2007;62(5-6):353–356.
- Do Nascimento A.M., De Oliveira D.C.R. A 5-deoxyflavone glycoside from *Calea uniflora* Less. (Asteraceae). Biochem. Syst Ecol. 2004; 32(11):1079–1081.
- Do Nascimento A.M., Salvador M.J., Candido R.C., De Albuquerque S., De Oliveira D.C.R. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). J Pharm Pharmacol. 2004;56(5):663–669.
- Do Nascimento A.M., De Albuquerque S., De Oliveira D.C.R. Evaluation of trypanocidal activity from *Calea uniflora* (Heliantheae-Asteraceae) extracts. Ver Bras Farmacogn. 2002;12:49–50.
- Ferrari F.C., Grabe-Guimarães A., Carneiro C.M., De Souza M.R., Ferreira L.C., De Oliveira T.T., Saúde-Guimarães D.A. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Lychnophora trichocarpa*, Brazilian arnica. Brazilian J Pharmacogn. 2012;22(5):1104–1110.
- Ferraz A.D.B.F., Pinheiro S.P., De Oliveira P.A., Lino F.L., Picada J.N., Pereira P. Pharmacological and genotoxic evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*. Lat Am J Pharm. 2009;28(3):858–862.
- Flora do Brasil; 2014 [accessed 13 feb. 2018]. *Calea uniflora*. Available from: <http://florado-brasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB103757>.
- Gurovic M.S.V., Castro M.J., Richmond V., Faraoni M.B., Maier M.S., Murray A.P. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chusqueira rinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae). Planta Med. 2010;76 (6):607-610.
- Hanazaki N., Zank S., Pinto M. Áreas da Ribeira de Imbituba: compreendendo a biodiversidade vegetal manejada para subsidiar a criação de uma Reserva de Desenvolvimento Sustentável. Biodivers Bras. 2012; 2(2): 50–64.
- Hibbs E.H., Zambon A.C. Fármacos que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos. In: Bunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C., Editors. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. Porto Alegre: McGraw Hill, 2012.p. 255-276.
- Laboratório multiusuário de biologia (LAMEB). 2017 [accessed 1 out. 2017]. Protocolo Padrão de Técnicas Histológicas Animal para Microscopia de Luz. Available from: <http://lameb.ccb.ufsc.br/protocolo-padrao-de-tecnicas-histologicas-animal-para-microscopia-de-luz/>.
- Lee J., Park T., Jeong S., Kim K.H., Hong C. 3-Hydroxychromones as cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and biological evaluation. Bioorg. Med Chem Lett. 2007;17(5):1284–1287.
- Lima T.C., Souza R.J., Santos A.D.C., Moraes M.H., Biondo N.E., Barison A., Steindel M., Biavatti M.W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. Nat Prod Res. 2016; 30(5):551–557.
- Neto F.M.A., Fagundes D.J., Beletti M.E., Novo N.F., Juliano Y., Penha-Silva N. Systemic use of *Solidago microglossa* dc in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. Braz J Morfol Sci. 2004;21(4):207-210.
- Ober A.G., Fischer N.H., Parodi F. Jamaicaídes A-D, four sesquiterpene lactones

- from *Calea jamaicensis*. *Phytochemistry*. 1986;25(2):877–881.
- Ober A.G., Urbatsch L.E., Fischer N.H. Sesquiterpene lactones from *Calea megacephala*. *Phytochemistry*. 1987;26(4):1204–1206.
- Obón C., Rivera D., Verde A., Valde A., Alcaraz F., Carvalho A.M. *Árnica*. A multivariate analysis of the botany and ethnopharmacology of a medicinal plant complex in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *J Ethnopharmacol*. 2012;144:44–56.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for Testing of Chemicals, No. 423. Acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for Testing of Chemicals, No. 407. Repeated dose 28- day oral toxicity study in rodents. 2008.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for Testing of Chemicals, No. 402 Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose procedure. 2017.
- Paul V., Balasubramaniam E., Kazil M. The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats: a serotonergic involvement in learning impairment. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol*. 1994;270(1):1–7.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14(3):149–167.
- Pruski J.F., Urbatsch L.E. Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. *Brittonia*. 1988;40(4):341–356.
- Ramos L.S., Cardoso P.S., Freitas M.D., Paghan R., Borges M.S., Citadini-Zanette V., Barlow J.W., Amaral P.A., Dalbó S. Popular medicinal uses of *Calea uniflora* less. (Asteraceae) and its contribution to the study of Brazilian medicinal plants. *An Acad Bras Cienc*. 2016;88(4):2319–2330.
- Ribeiro V.L.S, Vanzella C., Moysés F.S, Santos J.C Martins J.R.S, Poser G.L., Siqueira I.R. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain *Wistar* rats. *Vet Parasitol*. 2012;189(2–4):322–326.
- Rivera D., Verde A., Alcaraz F. Evidencia histórica sobre la génesis y difusión del concepto de “*Árnica*” en Europa Occidental. *Revista de Fito-terapia*. 2010;10(2):157–172.
- Rodrigues-Torres V.N., Machado J.D., Ramos L.S., Paghan R., Kautz J., Rouaud I., Sauvager A., Tomasi S., Dévéhat F.L., Dalbó S., Amaral, P.A. Phytochemical investigation, antinociceptive activity and cytotoxicity of crude extracts of *Calea uniflora* Less. *J Med Plants Res*. 2016.;10(39):695–704.
- Steinbeck C., Spitzer V., Starosta M., Von Poser G. Identification of two chromenes from *Calea serrata* by Semiautomatic structure elucidation. *J Nat Prod*. 1997;60(6):627–628.
- Torres-Rodríguez M.L., García-Chávez E., Berhow M., De Mejia E.G. Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *Calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2016;188:266–274.
- Vianna M.R.M., Alonso M., Viola H., Quevedo J., Paris F., Furman M., Stein M.L., Medina J.H., Izquierdo I. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learn Mem*. 2000;7:333–340.

REPORTE DE CASOS

Intoxicación con rodenticidas anticoagulantes: serie de casos y revisión de literatura Intoxication with anticoagulant rodenticides: Case series and review of the literature

Lugo, Marcos F.

Hospital J.B. Iturraspe, Santa Fe, Argentina.

marcosfedericolugo@hotmail.com

Recibido: 17 de marzo de 2019

Aceptado: 22 de agosto de 2019

Resumen. Introducción. Los superwarfarínicos (SWF) son una de las herramientas utilizadas por el ser humano para el control de roedores y a la vez son tóxicos para el hombre y pueden conducir a la muerte sin los debidos cuidados en su uso. Casos clínicos. Tres pacientes masculinos, que consultaron por sangrados (gingivorragia, epistaxis, hematuria, hemartrosis y hematomas cutáneos) asociados a alteraciones del coagulograma (Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial (KPTT) prolongados). Todos tuvieron exposición a superwarfarínicos. Nuestro servicio no dispone del análisis de SWF en suero. Se administró vitamina K₁ en los tres pacientes y plasma fresco congelado (PFC) en uno solo (sangrado mayor: hematuria). El seguimiento se realizó mediante controles seriados de coagulograma y su evolución fue favorable. Discusión. En todos los casos, el diagnóstico de intoxicación por SWF fue clínico, basado en características clínicas de pacientes y alteraciones en sus parámetros de coagulación, y debido a imposibilidad de derivación de análisis a otro laboratorio. Se realizó tratamiento específico (vitamina K₁ y PFC) según recomendación de expertos, ya que no hay hasta la fecha, estudios clínicos que evalúen las diferentes opciones terapéuticas. Conclusión. La intoxicación por SWF aunque no es frecuente, debe sospecharse en casos de paciente con coagulopatía sin otras causas que puedan justificarlo. El manejo del cuadro tóxico es la reposición de vitamina K₁ y de plasma fresco congelado, en casos donde se necesite una rápida corrección de la alteración hemostática, como los sangrados mayores. Es imprescindible la oportuna consulta con médicos hematólogos y/o la consulta con un centro regional de control de intoxicaciones para todas las exposiciones sospechosas por SWF.

Palabras clave: Intoxicación; Rodenticidas; Superwarfarínicos; Hemorragias; Vitamina K₁.

Abstract. Introduction. Superwarfarinics (SWF) are one of the tools used by humans for rodent control. They are toxic to humans and can lead to death without due care in its use. Clinical cases. Three male patients, who consulted due to bleeding (gingivorragia, epistaxis, hematuria, hamartrosis and skin hematomas) associated with coagulogram alterations (prolonged protombine time (PT) and partial thromboplastin time (KPTT)). All them exposure to superwarfarinics. SWF serum analysis was not available in our hospital. Vitamin K₁ was administered in all three patients and fresh frozen plasma (PFC) in only one (major bleeding: hematuria). The follow-up was performed by serial coagulogram controls and the evolution was. Discussion. In all cases, the diagnosis of SWF intoxication was clinical, based on clinical characteristics of patients and alterations in their coagulation parameters, due to the impossibility of deriving the analysis of SWF in serum to another laboratory. Specific treatment was carried out (vitamin K₁ and PFC) according to experts' recommendation, since there are no clinical studies to evaluate the different therapeutic options to date. Conclusion. SWF poisoning, although not frequent, should be suspected in patients with coagulopathy without other causes that may justify it. The management of toxic symptoms is the administration of vitamin K₁ and fresh frozen plasma, in cases where a rapid correction of the haemostatic alteration is required, such as major bleedings. It is essential to consult with hematologists and / or consult a regional poison control center for all suspicious exposures by superwarfarins.

Keywords: Poisoning; Rodenticides; Superwarfarins; Bleedings; Vitamin K₁.

Introducción

El control de roedores ha sido fundamental para la supervivencia del hombre, en lo que respecta a disminución de transmisión de enfermedades. Para ello, se han desarrollado diferentes raticidas, que pueden también, resultar tóxicos para los seres humanos (Gutiérrez y col. 2015; Feinstein y col. 2016). Los más utilizados actualmente están compuestos por an-

ticoagulantes de acción prolongada, llamados superwarfarínicos (difenacoum, brodifacoum y bromadiolona), cuyo mecanismo de acción es el antagonismo de la vitamina K (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología (ANMAT) 2017; Gutiérrez y col. 2015). La exposición de seres humanos a estos agentes puede generar, desde alteraciones

en el coagulograma que cursan asintomáticas, hasta hemorragias severas que pueden llevar a la muerte, dependiente de la dosis (Lisella y col. 1970; Srivastava y col. 2005; Bernyy col. 2010). Su gran absorción, tanto oral como cutánea, y su vida media prolongada, pudiendo tener efectos tóxicos por meses, son otras características que determinan su peligrosidad (Gutiérrez y col. 2015).

La exposición a estos venenos suele pasar inadvertida por ser generalmente de etiología accidental, aunque también puede ser intencional en casos con fines delictivos o autoagresivos (homicidio/suicidio).

El diagnóstico de intoxicación por superwarfarínicos es siempre un desafío, principalmente por la baja sospecha clínica, y por la dificultad de arribar a un diagnóstico de certeza a través de la investigación y cuantificación de los SWF en el suero.

Casos clínicos

Casos 1 y 2

Dos pacientes masculinos, de 21 y 25 años, hermanos, tabaquistas y etilistas de escasa jerarquía, consumidores habituales de cocaína, sin antecedentes patológicos personales ni familiares conocidos; uno de ellos recolector de residuos, el otro desempleado, consultaron por sangrados.

El mayor consultó por cuadro de 3 días de evolución caracterizado por gingivorragia y epistaxis intermitente, agregando hematuria macroscópica en las últimas 24 horas. Al examen físico, se encontraba afebril, estable hemodinámicamente, con presencia de restos hemáticos en encías y fosas nasales. Se solicitaron laboratorios los cuales mostraron hemograma, función renal, hepatograma e ionograma normales, y serologías para HIV, VHB y VHC no reactivas. Coagulograma: tiempo de protrombina (TP) incoagulable mayor a 80 s (10 – 14 s); RIN 9,2 (0,8 – 1,2) tiempo de tromboplastina parcial (KPTT) 73 s (25 – 45 s); tiempo de trombina (TT) 17,8 s (9 – 35 s); fibrinógeno 220 mg/dl (200 – 400 mg/dl). Se realizó ecografía abdominal y renovesical en las cuales no se constató ningún tipo de lesión ni alteraciones. El menor consultó únicamente por gingivorragia de un día de evolución. Al examen físico presentó restos hemáticos en cavidad oral, sin otros datos relevantes. Coagulograma: TP incoagulable, KPTT: 89 s, TT: 16 s y fibrinógeno: 230 mg/dl. El hemograma, la función renal y el hepatograma estuvieron dentro de los valores normales. Ambos tiempos de

coagulación revirtieron con la prueba de corrección con plasma normal en los dos pacientes. Se realizó el diagnóstico de coagulopatía adquirida secundaria a déficit de vitamina K probable. Al interrogatorio dirigido, ambos pacientes refirieron consumo de comida recolectada del lugar de trabajo del mayor de ellos; sitio donde en los últimos días se realizaron tareas de fumigación y aplicación de raticidas.

Se realizaron las siguientes medidas de tratamiento en ambos pacientes:

- Vitamina K₁ 20 mg/día por vía endovenosa.
- Plasma fresco congelado ajustado por peso (3U) ante la presencia de sangrados mayores (genitourinario) por única vez.

Evolucionaron de forma favorable, sin nuevos sangrados y con resolución de la clínica. Los valores del coagulograma obtenidos fueron en descenso hasta normalizarse al cuarto día del ingreso hospitalario, presentando TP 60 s a las 24 h, 37 s a las 48 h, 24 s a las 72 h y 14 s a las 96 h. La evolución de los valores hemostáticos fueron similares en ambos pacientes.

No fue posible realizar dosaje de superwarfarínicos en suero al no disponer de dicho examen complementario en nuestro hospital.

En los controles posteriores a la externación, presentaron coagulogramas normales, sin sangrados, a los 7 y 15 días del egreso hospitalario. Ninguno de los dos pacientes acudió a los controles posteriores.

Caso 3

Paciente masculino, de 38 años, tabaquista de 15 paquetes/año, sin antecedentes patológicos personales ni familiares conocidos; peón rural. Consultó por cuadro de 5 días de evolución caracterizado por gingivorragia y epistaxis de forma intermitente, agregando dolor y tumefacción en región dorsal de muñeca derecha y hematomas múltiples en ambos brazos y piernas. Negó otros tipos de sangrados o traumatismos. Al examen físico del ingreso, se encontraba afebril, estable hemodinámicamente, con presencia de restos hemáticos en encías y fosas nasales. Hematomas múltiples de diámetros inferiores a 10 cm en ambos brazos y en ambos miembros inferiores. Presentó tumefacción dolorosa en región dorsal de muñeca, con movilidad pasiva y activa limitada de articulación. Sin otros hallazgos de jerarquía al examen físico. Los parámetros del laboratorio al ingreso fueron: hemoglobina: 10 g/dl (13 – 16 g/dl); hematocrito: 46% (38 – 50%); volumen corpuscular medio: 88 fl (80 – 100 fl); hemoglobina cor-

puscular media: 36 pg (26 – 34 pg), globulos blancos: 7500 /mm³ (4500 – 10.000 /mm³) plaquetas: 310000/mm³ (150.000 – 400.000/mm³); funcion renal, hepatograma e ionograma normales. Coagulograma: TP: incoagulable, RIN: 10, KPTT 103 s, TT 15,8 s, fibrinogeno: 220 mg/dl y HIV no reactivo. Se realizó ecografía de muñeca derecha donde se evidenciaba líquido intraarticular anecoico homogéneo.

Se realizó la prueba de corrección con plasma normal, encontrándose que los valores de TP y KPTT revirtieron con el agregado de plasma normal. Se realizó el diagnóstico de coagulopatía adquirida secundaria a déficit de vitamina K probable. Al interrogatorio dirigido, el paciente refirió manipulación diaria de raticidas en su lugar de trabajo, sin recordar nombres genéricos ni comerciales de los rodenticidas utilizados.

Se inició administración de vitamina K (20 mg/día) EV por 5 días, evolucionando de forma favorable, con resolución de hematomas, sin sangrados, resolución de hemartrosis de muñeca derecha. Los valores del coagulograma fueron normalizándose, TP 82 s a 24 hs del ingreso, 54 s a 48 hs, 31 s a 72 hs, 22 s a 96 hsy 10 s al 5° día de internación. El paciente se controló por ambulatorio presentando buena evolución tanto clínica como bioquímica a los 7 y 15 días, al mes y a los 6 meses del egreso hospitalario.

Discusión

Los pacientes presentaron sangrados al momento de la consulta, de evolución aguda, sin embargo, el dato de mayor relevancia fue la localización difusa de dichos sangrados (gingivorragia, epistaxis, hematuria, cutáneo e incluso articular) lo que excluye de forma inmediata causas locorregionales de hemorragias. No refirieron el consumo de fármacos ni tenían ningún antecedente que pudieran justificar los síntomas.

Ante la sospecha de causa sistémica, se solicitaron análisis de laboratorios, los cuales evidenciaron alteración de la coagulación, en valores de TP y KPTT. Entre las posibles causas de alteración de la hemostasia, diagnósticos como hemofilia, coagulación intravascular diseminada o insuficiencia hepática, fueron fáciles de eliminar de la lista de posibles etiologías por el estado general y características de los pacientes. Fue aquí donde la posibilidad de exposición a tóxicos empezó a ser protagonista (Lisella y col. 1970; Berny y col. 2010). Al volver a interrogarlos sobre posible contacto con tóxicos, refirieron contacto reciente con raticidas en sus lugares de trabajo. Cabe destacar

que el uso de cocaína, muchas veces preparada con múltiples tóxicos con el único objetivo por parte del vendedor de aumentar la cantidad de droga posible para vender, lleva a la utilización de tóxicos disponibles para cualquier persona, como los raticidas, por lo cual la exposición tóxica por consumo de cocaína es otra posible fuente de exposición (Waijen y col. 2001). Se estableció como diagnóstico probable intoxicación por superwarfarínicos, debido al cuadro clínico compatible que presentaban y la probable exposición al tóxico en cuestión. Se descartó la participación de warfarina o warfarínicos de primera generación debido a la persistencia de alteraciones del coagulograma pasadas las 40 horas de exposición al tóxico.

Se realizó una búsqueda bibliográfica con pobres resultados en cuanto a la calidad de la evidencia científica. Dado que no es posible contar con ensayos clínicos que evalúen opciones terapéuticas, es necesario recurrir a recomendaciones según consensos de expertos (Svendsen y col. 2002; Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 2002) y reportes de casos clínicos (Hollinger y col. 1993; Watt y col. 2005; Gunja y col. 2011; Cao y col. 2012; Card y col. 2014; Narli Özdemir y col. 2016; Larga y col. 2016).

Se decidió iniciar tratamiento según la fisiopatología y el mecanismo de acción del tóxico involucrado. Los superwarfarínicos utilizados en Argentina (difenacoum, brodifacoum y bromadiolona) presentan un tiempo de vida media muy variable, dependiendo de dosis del tóxico en cuestión y del metabolismo hepático y renal de la persona expuesta, provocando déficit de vitamina K, y en consecuencias hemorragias espontáneas. Se solicitó intervención por parte del servicio de Hematología, decidiendo administrar fitomenadiona (vitamina K₁) endovenosa de forma diaria para una continua reposición y a su vez, realizar transfusiones de plasma fresco congelado para corrección hemostática rápida ante la presencia de un sangrado mayor activo como la hematuria en uno de los tres pacientes (Wu y col. 2009). La conducta terapéutica siempre estuvo sujeta a cambios, según estabilidad clínica y hemodinámica del paciente en los controles diarios.

Para realizar el diagnóstico de certeza de cualquier intoxicación se requiere demostrar la presencia de dicho tóxico en el organismo. La no disponibilidad de dicho estudio en nuestro establecimiento y las dificultades burocráticas en la derivación de la muestra para análisis hacia un centro de mayor complejidad, hicieron que

no fuera posible realizarlo. No obstante, el resultado positivo, en este caso, hubiese sido meramente epidemiológico, ya que no hubiera cambiado las conductas terapéuticas adoptadas. Los controles posteriores al alta fueron cada vez menos frecuentes en función del estado hemodinámico y resultados del coagulograma del paciente. Al no haber evidencia científica fuerte acerca de un correcto seguimiento clínico en estos casos, se decidió junto a Hematología, realizarlos inicialmente semanal y luego mensual, siempre haciendo hincapié en pautas de alarma para la consulta urgente al hospital.

Conclusión

La intoxicación por superwarfarinicos, aunque no es frecuente, debe sospecharse en casos de paciente con coagulopatía sin otras causas que puedan justificarlo. El manejo del cuadro tóxico es la reposición de vitamina K₁ y la administración de plasma fresco congelado, en casos donde se necesite una rápida corrección de la alteración de la hemostasia, como los sangrados mayores. Es imprescindible la oportuna consulta con médicos hematólogos o la consulta con un centro regional de control de intoxicaciones para todas las exposiciones sospechosas por superwarfarinicos.

Consideraciones éticas: Se contó con el consentimiento escrito de los tres pacientes.

Bibliografía citada

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología (ANMAT) [en línea]. Listado de Insecticidas y Raticidas. Diciembre, 2017. [Actualizado al 1 de diciembre de 2017; consulta 5 de marzo de 2019]. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_Insecticidas_Raticidas_2017.pdf

Berny P., Velardo J., Pulce C., D'Amico A., Kammerer M., Lasseur R. Prevalence of anticoagulant rodenticide poisoning in humans and animals in France and substances involved. *Clin Toxicol (Phila)*. 2010;48(9):935-41.

Cao X., Li L., Zheng Y. Clinical analysis of 12 patients caused by long-acting anticoagulant rodenticide occult poisoning. *Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban*. 2012;37(8):849-53.

Card D.J., Francis S., Deuchande K., Harrington D.J. Superwarfarin poisoning and its management. *BMJ Case Rep*. 2014; 2014:bcr2014206360.

Feinstein D.L., Akpa B.S., Ayee M.A. The emerging threat of superwarfarins: history, detection, mechanisms, and countermeasures. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1374(1):111-22.

Gunja N., Coggins A., Bidny S. Management of intentional superwarfarin poisoning with long-term vitamin K and brodifacoum levels. *Clin Toxicol (Phila)*. 2011;49(5):385-90.

Gutiérrez W., Cerda P., Plaza-Plaza J.C., Mieres J.J., Paris, E., Ríos J.C. Caracterización de las exposiciones a plaguicidas entre los años 2006 y 2013 reportadas al Centro de Información Toxicológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Revista Médica de Chile*. 2015;143(10):1269-1276.

Hollinger B.R., Pastoor T.P. Case management and plasma half-life in a case of brodifacoum poisoning. *Arch Intern Med*. 1993;153: 1925.

Larga J., Peng X., Luo Y., Sun Y., Lin G., Wang Y., Qiu Z. Treatment of a long-acting anticoagulant rodenticide poisoning cohort with vitamin K1 during the maintenance period. *Medicina (Baltimore)*. 2016;95 (51): e5461.

Lisella F.S., Long K.R., Scott HG. Toxicology of rodenticides and their relation to human health. *J Environ Health*. 1970;33: 231.

Ministerio de Salud de la Nación (MSAL) [en línea] Argentina: Manual de Atención Primaria de Intoxicaciones, 2002 [actualizado al 1 de enero de 2002; consulta 5 de febrero de 2019] Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/ministerio/intoxicaciones/manual_toxi.pdf.

Narli Özdemir Z., Şahin U., Merter M., Gündüz M., Ateşgaoğlu B., Bektaş M. A Case of Superwarfarin Poisoning Due to Repetitive Occupational Dermal Rodenticide Exposure in a Worker. *Turk J Haematol*. 2016;33(3):251-3.

Srivastava A., Peshin S.S., Kaleekal T., Gupta S.K. An epidemiological study of poisoning cases reported to the National Poisons Information Centre, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi. *Hum Exp Toxicol*. 2005;24:279;75:51.

Svendson S.W., Kolstad H.A., Steesby E. Bleeding problems associated with occupational exposure to anticoagulant rodenticides. *Int Arch*

Occup Environ Health. 2002;75:515–517.

Waijen S.A., Hayes D.Jr, Leonardo JM. Severe coagulopathy as a consequence of smoking crack cocaine laced with rodenticide. N Engl J Med. 2001;345(9):700-1.

Watt B.E., Proudfoot A.T., Bradberry S.M., Vale

J.A. Anticoagulant rodenticides. Toxicol Rev. 2005;24:259.

Wu Y.F., Chang C.S., Chung C.Y., Lin H.Y., Wang C.C., Shen M.C. Superwarfarin intoxication: hematuria is a major clinical manifestation. Int J Hematol. 2009;90(2):170-173.

**Mordedura de *Phalotris lemniscatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854)
(Squamata, Dipsadidae) en Uruguay
Phalotris lemniscatus (Duméril, Bibron & Duméril, 1854)
(Squamata, Dipsadidae) bites in Uruguay**

Negrin, Alba^{1*}; Morais, Víctor²; Carreira, Santiago^{3,4,5}; Tortorella, María Noel¹

¹Departamento de Toxicología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. Universidad de la República, Av. Italia s/n. Montevideo, 11600, Uruguay. ²Departamento de Desarrollo Biotecnológico y Producción, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. Alfredo Navarro 3051, Montevideo, 11600, Uruguay. ³Bioterio de Animales Ponzofiosos (Serpentario), Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Av. Alfredo Navarro 3051, Montevideo, 11600, Uruguay. ⁴Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Udelar, Iguá 4225, 11400. Montevideo, Uruguay. ⁵Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural, 25 de Mayo 582, 11000, Montevideo, Uruguay. Telefax: +59824870300

*anegrin@hc.edu.uy

Recibido: 28 de marzo de 2019

Aceptado: 25 de julio de 2019

Resumen. *Phalotris lemniscatus* es la única especie representante del género *Phalotris* en Uruguay. Esta especie tiene una amplia distribución que incluye Uruguay, Rio Grande do Sul en Brasil y el norte de Argentina que se extiende a las áreas fronterizas con Bolivia y Paraguay. Aunque este ofídico no es agresivo, se registraron dos accidentes en Uruguay en los que se observó acción local y sistémica del veneno. Los mismos ocurrieron en las manos después de manipulación excesiva y prolongada de los ejemplares. Localmente presentaron edema leve, pero en términos sistémicos el veneno de *Phalotris* causó alteraciones en la coagulación. Los pacientes se recuperaron totalmente después de 3 días. Serán necesarios más estudios para establecer una terapia adecuada para los envenenamientos graves provocados por esta especie.

Palabras clave: *Phalotris lemniscatus*; Accidente ofídico; Anticoagulación; Antiveneno; Suero antiofídico

Abstract. *Phalotris lemniscatus* is the only species representative of *Phalotris* genus in Uruguay. This species has a wide distribution that includes Uruguay, Rio Grande do Sul in Brazil and northern Argentina extending to the areas bordering Bolivia and Paraguay. Although this snake is not aggressive, there were two snakebite accidents in Uruguay. They occurred on the hands after excessive and prolonged handling of the specimens. Locally they showed mild edema, but in systemically *Phalotris* venom caused alterations in blood coagulation. The patients recovered completely after 3 days. More studies will be required to establish an adequate therapy for *Phalotris* severe envenomations.

Keywords: *Phalotris lemniscatus*; Snakebite; Anticoagulation; Antivenom; Snake antivenom

Introducción

El género *Phalotris* Cope, 1862 pertenece a la familia Dipsadidae y tiene una distribución relativamente amplia en América del Sur, incluido el centro de Brasil, y desde el sur de Bolivia hasta la Patagonia en Argentina (Ferrarezzi 1993). Actualmente consta de 15 especies (Carreira y col. 2005; Jansen y Köhler 2008), ubicadas en los grupos: bilineatus, nasutus y tricolor. Este género tiene algunas características morfológicas particulares, como son las escamas frontales fusionadas en una sola placa transversal, cuerpo cilíndrico con 15 escamas dorsales sin reducción que termina en una cola corta, cabeza pequeña y un poco diferente del resto

del cuerpo con un ojo también reducido y un maxilar corto con 4-5 dientes y dos colmillos posteriores opistoglifos (Ferrarezzi 1993; Carreira y col. 2005).

El único representante de este género en Uruguay es *Phalotris lemniscatus* (Duméril, Bibron y Duméril, 1854) perteneciente al grupo bilineatus (Figura 1). Esta especie tiene una amplia distribución que incluye Rio Grande do Sul en Brasil, norte de Argentina extendiéndose a las áreas fronterizas con Bolivia y Paraguay, y en Uruguay, está presente en todo su territorio (Carreira y col. 2005; Carreira y Maneyro 2013). A menudo se encuentra en áreas abiertas con



Figura 1. *Phalotris lemniscatus* (Fotografía: S. Carreira).

afloramientos rocosos y áreas arenosas, adaptándose bien a las áreas urbanas y suburbanas (Carreira y col. 2005; Carreira y Maneyro 2013). Los hábitos fosoriales ciertamente favorecen su adaptación dándole menos visibilidad en áreas antropizadas. Por otro lado, es importante señalar que ésta especie presenta un cuerpo delgado con una cabeza relativamente reducida, cola corta y un tamaño que no sobrepasa generalmente los 500 mm de longitud total, aunque se han reportado ejemplares de hasta 680 mm (Carreira y col. 2005; Carreira y Maneyro 2013). Se alimenta de pequeños reptiles como anfibios, otros ofidios y saurios (Carreira y col. 2005). Suele realizar despliegues defensivos ante la presencia del hombre, comportándose de forma tímida y nunca agresiva. El patrón de color y el diseño permiten una fácil identificación entre las diferentes especies de ofidios que se encuentran en Uruguay. La coloración dorsal es rojiza o anaranjada con tres líneas negras longitudinales, la línea de la región vertebral puede estar ausente o reducida. La cabeza es principalmente negra y tiene un collar blanco. El área ventral es negra.

La composición de su veneno es hasta el momento desconocida. La primera información sobre este aspecto en un miembro del género *Phalotris*, fue sobre *Phalotris mertensi* (Hoge 1955) en un trabajo publicado por Fernandes Campos y col. (2016). Este veneno tiene una mezcla compleja de péptidos y proteínas e incluye proteínas tipo Kunitz, metaloproteasas, amino oxidasas,

fosfolipasas A2, lipasas, entre otras.

Solo un caso de accidente en humanos fue comunicado en la literatura médica brasileña relacionada con el género, en concreto con *P. trilineatus* [Duméril, Bibron y Duméril, 1854], en el cual el paciente mostró dolor local y alteraciones graves en la coagulación (Lema 2007). En consecuencia, la información científica sobre el envenenamiento es muy escasa.

En Uruguay, el Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT), único centro de intoxicaciones de Uruguay recibe las consultas y notificaciones de mordeduras (Morais y col. 2012). Estos eventos son de comunicación obligatoria ante la autoridad sanitaria, desde el año 1990, lo que permite la adquisición de un registro preciso de cada accidente, permitiendo el conocimiento de los agentes.

Cada año, el CIAT recibe alrededor de cien eventos de mordeduras de ofidios, principalmente relacionados con tareas rurales. De ellos unos 60 a 70 casos registrados corresponden a dos especies del género *Bothrops*: *B. alternatus* y *B. pubescens* (Carreira y col. 2008) requiriendo los pacientes instalaciones hospitalarias para observación clínica, realización de exámenes analíticos y la administración del suero antiofídico específico. Los otros casos se deben a una amplia gama de ofidios, que presentan síntomas locales y leves, con una evolución benigna y solo necesitan observación clínica y tratamiento sintomático (Negrin y col. 2011). En el año que ocurrieron estos dos accidentes las consultas en el CIAT por ofidios fueron 103 casos, de los cuales 66 fueron provocados por *Bothrops*.

Objetivos

Se presentan los dos primeros casos clínicos de mordeduras por este tipo de ofidio, comunicados al Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico del Uruguay, describiéndose sus manifestaciones clínicas, análisis de laboratorio y se discute el manejo terapéutico instaurado.

Casos clínicos

Caso 1: adolescente de 13 años, sano, ingresó a emergencia por gingivorragia, manifestando haber sido mordido por un ofidio unas doce horas antes. El paciente refirió que estaba jugando con el ofidio y fue mordido en el segundo dedo de su mano izquierda. En una descripción posterior más detallada manifestó que, jugando con la serpiente fue mordido por un tiempo prolongado. El paciente relató que

el ofidio involucrado, era un animal de aproximadamente 20 cm de largo con líneas longitudinales rojas, amarillas y negras, y un collar blanco en la cabeza. El mismo fue capturado por un familiar de la víctima lo que permitió su identificación como *Phalotris lemniscatus* (Figura 2). El paciente manifestó el desarrollo de una equimosis en la zona, sin dolor, treinta minutos después de la mordedura, a pesar de lo cual no consultó de inmediato.



Figura 2. Ofidio involucrado en el caso 1. Se aprecian las rayas longitudinales y el collar blanco.

Al ingreso, se describieron dos punciones separadas por unos 5 mm con equimosis que comprendía totalmente la tercera falange del segundo dedo de la mano izquierda, se obtuvo una única fotografía de la lesión, de mala calidad técnica no constatándose en ella más que una puntura, y la equimosis referida (Figura 3). Llamó la atención que no se observaran otras marcas típicas de las mordeduras de ofidios opistoglifos, pero hay que considerar que este grupo tiene pocos dientes a nivel del maxilar (4-5) contra los 10-13 que tienen, por ejemplo, algunos representantes del género *Philodryas*. También presentó edema leve, localizado y, unas 8 horas después, comenzó un sangrado gingival que determinó la consulta a las doce horas de la mordedura. Presentó evolución con signos vitales normales. En los análisis de laboratorio se destacan las alteraciones



Figura 3. Mordedura caso 1. Se aprecia equimosis de tercera falange del dedo afectado.

de la coagulación (Tabla 1). Nunca presentó, en la evolución, elevación significativa de enzimas musculares.

Se decidió su internación para observación y administración de antiveneno. La coagulación se restableció paulatinamente mostrando mejoría clínica y de laboratorio a las 12 horas, mejorando completamente a las 24 horas del tratamiento (Tabla 2). Se discutió la indicación de uso de vitamina K y plasma fresco, siendo contraindicada esta terapéutica por los médicos toxicólogos.

El control clínico a las 2 semanas no mostró síntomas o signos locales ni sistémicos destacables. El paciente no concurrió a la consulta de control a los 30 días de la mordedura.

Caso 2: mujer de 61 años con antecedentes personales de esclerosis múltiple, con moderado compromiso de su movilidad y coordinación, en tratamiento con fisioterapia, interferón β , quetiapina, carbamazepina, amitriptilina, fluoxetina y vitamina B. Ingresó a centro asistencial, 12 horas después de haber sido mordida por un ofidio en la mano derecha mientras lo manipulaba para sacarlo de su jardín. No pudo precisar el tiempo de mordida, pero refirió dificultad para retirarlo. Presentó dolor local muy leve y cefaleas, además de sangrado en la zona de la mordedura, y sangrado gingival todo lo cual motivó la consulta.

La serpiente involucrada fue descrita por la paciente como pequeña, con líneas longitudinales rojas, amarillas y negras, y un "collar blanco" en la cabeza. El ejemplar fue capturado e identificado como *Phalotris lemniscatus* (Figuras 4 y 5). Al ingreso, el examen físico mostró: dos pun-

Tabla 1. Evaluación de parámetros de coagulación al ingreso.

Paciente	Tiempo de coagulación	Protrombina	Fibrinógeno
1	> 30 min	Indetectable	Indetectable (< 60 mg/dl)
2	> 30 min	Indetectable (INR >6)	Indetectable (< 60 mg/dl)

Tabla 2. Análisis de laboratorio luego de la administración del suero antiofídico. Exámenes realizados al paciente 1 a las 24 horas y al paciente 2 a las 36 horas de administrar el suero antiofídico.

Paciente	Tiempo de coagulación	Protrombina / INR	Fibrinógeno
1	5 min	78% / 1,17	291 mg/dl
2	10 min	80% / 1,08	552 mg/dl

ciones apenas separadas unos pocos mm una de la otra (no fueron medidas con precisión) en el espacio interdigital entre los dedos pulgar e índice de mano derecha, y leve edema local (Figura 6). La presión arterial, el pulso, la respiración y la temperatura axilar fueron referidos como normales, sin embargo, los parámetros de coagulación se encontraron alterados (Tabla 1). El hemograma, y la función renal fueron normales. La paciente mostró los siguientes signos, orinas hemáticas, epistaxis y hemoptisis. La hematuria fue confirmada en el examen de orina. Ante una coagulopatía, causante de las referidas manifestaciones clínicas, ingresó a cuidados intensivos, requiriendo ventilación no invasiva. Dada la gravedad del cuadro clínico se discuten al igual que en caso 1, varios tratamientos. Finalmente recibió 8 ampollas de suero antiofídico, precedido de corticoides.

**Figura 4.** Ofidio involucrado en el caso.

Después del tratamiento con antiveneno, la paciente alcanzó los valores normales de coagulación a las 36 horas (Tabla 2), aunque el egreso hospitalario fue a los 9 días, cuando el restablecimiento fue completo. El control evolutivo a los 20 días, no mostró síntomas o signos locales o sistémicos destacables. De esta paciente no tenemos otros datos de su evolución.

Discusión y conclusiones

Estos casos fueron los primeros informes de accidentes por el género *Phalotris* desde que existe registro en Uruguay. Las características morfológicas del ofidio y de su comportamiento hacen improbable los accidentes en humanos. Los ejemplares involucrados en los accidentes fueron pequeños y con una cabeza reducida (Figuras 2 y 4). Además, se conoce a esta especie por su carácter poco agresivo e incluso tímido. Solo en circunstancias muy especiales, tales como la manipulación excesiva, pueden llegar a morder con la consecuente inoculación de veneno generando así un cuadro clínico. La figura 5 permite apreciar el pequeño tamaño del ejemplar involucrado en el caso 2.

Ambos eventos ocurrieron al cabo de un corto periodo de días, pero no tuvieron relación entre sí, y se registraron en zonas suburbanas distantes unos 220 km uno del otro.

Los accidentes ocurrieron en las manos, luego de una manipulación excesiva, inadecuada y prolongada del ofidio. En este sentido cabe señalar que el primer caso ocurre cuando el niño manipula e intenta introducir su dedo en la boca del ofidio intencionalmente, en una circunstancia que difícilmente se hubiera dado de forma natural. En el segundo caso no se cuenta con información precisa sobre el tiempo y modo de la



Figura 5. Se evidencia el pequeño tamaño del ofidio, se puede comparar con la mano que sostiene el frasco (Tomado de Ravera 2012)

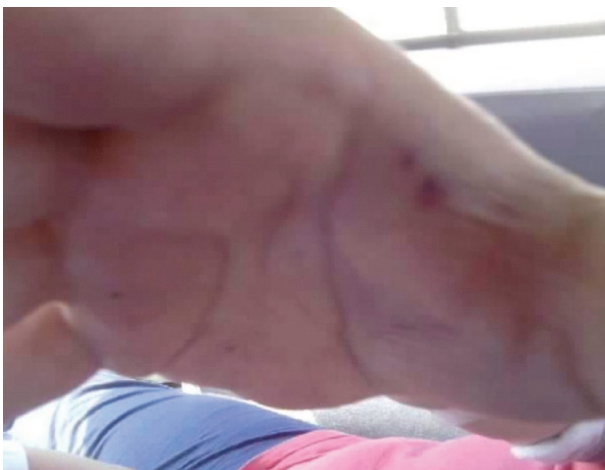


Figura 6. Mordedura caso 2. Se visualizan las marcas de la mordedura.

manipulación, aunque dados los antecedentes patológicos de la paciente, podemos plantear que su dificultad motora y de coordinación produjo un escenario favorecedor para el accidente. En ambos casos la distancia entre las impresiones dentarias es un punto que merece ser comentado. En el caso 1, no es congruente con la longitud declarada del ofidio. Se describe una separación dentaria, excesiva para la longitud referida del animal. Esas medidas fueron estimadas en la emergencia del hospital en condiciones asistenciales, y posiblemente no haya sido adecuadamente mensurado. En la *figura 3*, no se visualizan las punciones descritas. Para un individuo de esta especie de 20 cm de largo total, la distancia entre colmillos no debería superar los 3 mm. Por estos motivos suponemos que el relato del médico que lo asistió inicialmente, no es objetivo en cuanto a la distancia de las punciones, ni a la longitud del animal. No contamos con otras referencias claras que nos permitan explicar estas incongruencias.

En ambos casos llama la atención la ausencia de otras marcas típicas de la mordedura de ofidios opistoglifos. No se visualizan marcas de dientes maxilares, palatinos o mandibulares característicos en las mordeduras de ofidios opistoglifos. Creemos que podría deberse, bien a la posición de la mordedura, o bien a que una parte de la dentición se haya desprendido debido a la manipulación forzada e inexperta (sobre todo en caso 1) realizadas por los pacientes en los momentos previos al accidente. Sin embargo, por la experiencia de la manipulación en condiciones de laboratorio sabemos que es un ofidio que tiene mucha fuerza en la mordida (recuerda al género *Micrurus*) por lo cual es muy probable que la ausencia de otras marcas se deba sencillamente a observaciones imprecisas acompañadas de un material fotográfico de mala calidad en el cual no es posible ver estos detalles. La mala calidad de las fotografías es sin dudas una limitante para realizar un correcto análisis con este nivel de detalle de las características de la mordedura.

Cabe mencionar que en ambos casos surgió la descripción espontánea de las características de morfología y coloración del ofidio involucrado.

El diagnóstico clínico se aleja de un accidente bothrópico típico por las características de las punturas, la ausencia de equimosis peri-puntura, y la presencia de edema escaso (y que retrocede en horas), al contrario de lo que ocurre en un accidente provocado por *Bothrops*.

La descripción y captura del agente, es lo que reafirma que estamos ante dos casos de emponzoñamiento por *Phalotris lemniscatus*.

Si bien se discutieron distintos tratamientos posibles, debido a la gravedad de cada caso, se administró suero antiofídico (Instituto Vital Brazil) sin ser posible llegar a concluir sobre su efectividad. Según la epidemiología del accidente ofídico en el Uruguay, los casos de ofidismo que presentan anticoagulación se deben a accidentes causados por ejemplares del género *Bothrops*, por lo cual, al inicio, y con base en estos datos y en la clínica asociada, se planteó la administración de dicho suero. Ante la falta de tratamiento específico y debido a los importantes efectos en la coagulación se mantuvo la indicación de su uso por analogía de forma "empírica" de suero antiofídico anti-bothropico en busca de una posible neutralización cruzada. El tiempo transcurrido en la restauración de la coagulación, tras la aplicación de 8 viales de antiveneno (dosis que se aplica ante un accidente bothrópico grave) aleja el planteo que se tratara de un ejemplar de *Bothrops*. Esta misma latencia indicaría que la restauración de la coagulación no estaría directamente relacionada con la aplicación del antiveneno, sobre todo considerando la pequeña cantidad de veneno que podría haber inoculado un animal de esas dimensiones.

Se planteó por parte de los médicos tratantes la indicación de uso de vitamina K y plasma fresco, siendo contraindicada esta terapéutica por los médicos toxicólogos del CIAT. La administración de estos medicamentos no está indicada en las coagulopatías por consumo de factores, plaquetas y fibrinógeno, dado que produce una agravación del cuadro. Pese a desconocer el mecanismo de anticoagulación suponemos en estos casos y según los hallazgos de laboratorio, una acción sobre el fibrinógeno causando desfibrinación, disminuyendo los niveles de fibrinógeno, prolongando el tiempo de coagulación y de protrombina. Si bien no se conoce la composición de este veneno, en el veneno de otras *Phalotris* por estudios proteómicos se encontraron componentes que pueden afectar la matriz extracelular y a los componentes del sistema de coagulación (Fernades Campos y col. 2016). También podría asociarse por efecto del veneno sobre los vasos dando una coagulación intravascular diseminada con consumo de factores y plaquetopenia. Estos aspectos fisiopatológicos podrían explicar la acción del veneno de *P.*

lemniscatus. De existir en éste hemorragias, se sumaría como elemento facilitador de sangrados, tales como la gingivorragia, epistaxis y hemoptisis (presente en el caso 2), y estas han sido descritas para el veneno de otras *Phalotris* (Fernades Campos y col. 2016).

De acuerdo con el protocolo local, se administró en ambos casos, hidrocortisona 500 mg vía intravenosa, como premedicación, seguida a los 30 minutos de 8 viales de suero antiofídico específico antiofídico (dosis pautada para ser usada en casos de anticoagulación) referido por vía intra venosa. Los pacientes paulatinamente fueron normalizando la coagulación y se constataron valores que tendían a la normalización entre 24 y 36 horas de recibida la seroterapia. No se desarrollaron reacciones adversas al suero con evolución satisfactoria, y sin complicaciones. En ambos casos el primer control de coagulación, se hizo siguiendo el protocolo nacional para el accidente ofídico, es decir, a las 12 horas de la perfusión del suero hiperinmune, constatándose mejora, pero no normalización de éstos. La paciente del caso 2, es portadora de enfermedad crónica, por lo que recibe múltiples medicamentos; presentó sangrado a nivel respiratorio, requiriendo tratamientos de soporte más invasivos, aunque se produjo una mejora de la anticoagulación luego de la administración del suero antiofídico. Sin embargo, no es posible asegurar la eficacia del suero antiofídico, y menos aún realizar conclusiones sobre el tiempo de normalización de la coagulación.

En la actualidad se están realizando estudios de laboratorio que han demostrado reactividad cruzada, pero no han podido detectar neutralización cruzada *in vitro*. Se espera en un futuro cercano poder determinar, si existe y en qué grado, una posible neutralización cruzada.

En conclusión, estamos frente a un ofidio con un veneno potencialmente tóxico para los humanos, cuya composición es aún desconocida. Debido a sus características morfológicas y etológicas los accidentes son excepcionales, y ocurren por la manipulación directa e inexperte del ofidio.

Agradecimientos: A la Dra. Mónica Cohn y Dr. Marcelo Radicioni por la contribución con los datos clínicos e imágenes.

Bibliografía citada

Carreira S., Maneyro R. Guía de reptiles del Uruguay. Montevideo: Ediciones de la Fuga, Mastergraf; 2013.

Carreira S., Meneghel M., Achaval F. Reptiles de Uruguay. Montevideo: DI.R.A.C., Facultad de Ciencias, Universidad de la República; 2005.

Carreira S., Negrin A., Tortorella M.N., Pino A., Menéndez C. Ofidismo en Uruguay. Especies peligrosas y características del accidente ofídico. Montevideo: CID/CEUR, Tradinco; 2008.

Fernandes Campos P., Andrade-Silva D., Zelanis A., Franco Paes Leme A., Teixeira Rocha M.M., Menezes M.C., Serrano S., Junqueira-de-Azevedo I. Trends in the Evolution of Snake Toxins Underscored by an Integrative Omics Approach to Profile the Venom of the Colubrid *Phalotris mertensi*. Genome Biol Evol. 2016;8(8):2266–2287.

Ferrarezzi H. Nota sobre o gênero *Phalotris* com revisão do grupo *Nasutus* e descrição de três novas espécies (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae). Mem Inst Butantan. 1993;55(1):21-38.

Jansen M., Köhler G. A new species of *Phalotris* from the eastern low lands of Bolivia (Reptilia, Squamata, Colubridae). Senckenb Biol. 2008;88(1):103-110.

Lema T. Report of a Human Ophidic Accident by *Phalotris trilineatus* (Snakes, Colubridae) on Southern Cost of Brazil. Caderno de Pesquisa Sér Biologia. 2007;19(2):6-16.

Morais V., Negrin A., Tortorella M.N., Massaldi H. Evolution of venom antigenaemia and antivenom concentration in patients bitten by snakes in Uruguay. Toxicon. 2012;60(6):990-994.

Negrin A., Rosenberg N., Tortorella M.N. Mordeduras de ofidios en Intoxicaciones. Casuísticas del Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico. Amalia Laborde Compiladora. Montevideo: Biblioteca plural Departamento de publicaciones de la Unidad de comunicación de la Universidad de la Republica (UCUR); 2011.

Ravera F. A propósito de un caso local. Culebras ponzoñosas. Cooperativa Médica de Rocha. [en línea]. Comisión de Seguridad del Paciente. Boletín mensual. Febrero 2012. Disponible en: <http://files.cosepa.webnode.com.uy/200000002-6df2e6eed2/BOLETIN%20N%C2%BA%201%20COSEPA%20COMERRO%20ROCHA.pdf> (Consulta: 25 de julio de 2019).

COMUNICACIONES BREVES

Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study

Rubio, Nélica Cristina¹; Moreda-Piñeiro A.²; Bermejo-Barrera P.²; Bermejo A.M.³

¹Laboratorio de Toxicología y Química Legal (LATOQUIL). Cipolletti, Río Negro. Patagonia. Argentina. ²Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela -España. ³Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR), Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela. Rúa de San Francisco, s/n.15782. Santiago de Compostela - España.
***cristinarubio2@gmail.com**

Recibido: 16 de marzo de 2019

Aceptado: 5 de junio de 2019

Resumen. Actualmente el fluido oral (FO) es aceptado como una matriz biológica alternativa para detectar drogas en toxicología clínica y forense. En países como Argentina donde el uso de hojas de coca (mascarar hojas de coca o beber té de coca) es legal son necesarios procedimientos adecuados para lograr una clara diferenciación entre los individuos que usan las hojas de coca de manera legal de aquéllos que usan cocaína en forma ilegal. Poca es la información que hay en la literatura sobre el perfil de los alcaloides de la hoja de coca en FO de personas que mascan hojas de coca o toman té de coca y hasta el presente trabajo no se hallaron datos sobre el perfil en FO de la higrina (HIG) y cuscohigrina (CUS). De este estudio preliminar participaron dos voluntarios. Los resultados mostraron que la CUS e HIG siguieron siendo positivas después que la cocaína (COC) y benzoilecgonina (BE) cayeron por debajo de los valores *cut-off* propuestos por las guías internacionales para FO en casos de screening (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) en el caso del mascarador de coca. En el participante que tomó una taza de té de coca, en el último punto examinado (1 h) resultó ser positivo para la COC y BE y también para la CUS e HIG. El FO podría ser una muestra útil para confirmar el uso legal de la hoja de coca, aun cuando futuros estudios son necesarios para corroborar estos primeros datos.

Palabras clave: Fluido oral; Mascaradores de coca; Té de coca; Cuscohigrina; Higrina

Abstract. Nowadays oral fluid (OF) is accepted as an alternative biological sample for detecting drugs in clinical and forensic toxicology. In countries like Argentina, where the use of coca leaves (coca leaves chewing and coca tea drinking) is legal, adequate procedures are required to allow a clear differentiation between people who use coca leaves (legal practice) and those who use cocaine (illicit practice). There is scarce literature regarding coca leaf alkaloids profile in OF from people who chew coca leaves and drink coca tea. Until now, coca leaf alkaloids profile of hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) in OF were not described in the literature. The current preliminary study was performed with two healthy volunteers. In this research CUS and HYG have been found to be positive (detectable) even when cocaine (COC) and benzoylecgonine (BE) are dropped below the cut-off values proposed by international guidelines for screening (15 to 20 ng/mL), and confirmation (8 to 10 ng/mL) in OF. In addition, CUS and HYG were also found to be positive at the same time of the last detection of COC and BE after coca tea consumption. The OF would be a useful sample to confirm the legal use of coca leaf, even when more researches are therefore needed.

Keywords: Oral fluid; Coca chewers; Coca tea; Cuscohygrine; Hygrine

Introducción

En países como la Argentina, Perú o Bolivia donde mascar hojas de coca o beber té de coca es legal (Ley 23737/1989 (InfoLEG)), son necesarios procedimientos que permitan diferenciar estas prácticas legales del uso ilegal del consumo de cocaína. Se requiere, por lo tanto, en situaciones judiciales o en casos de accidentes automovilísticos, como en situaciones de controles laborales o de catástrofes donde los responsables presentan un resultado positivo de cocaína y alegan un uso legal de la hoja de coca (mascado o beber té de

coca), contar con herramientas analíticas que nos permitan una clara diferenciación de estas dos situaciones.

Recientemente dos alcaloides de la hoja de coca: higrina (HIG) y cuscohigrina (CUS), han sido propuestos como marcadores del mascado de la hoja de coca para propósitos de *screening*/confirmación en muestras de pelo y orina, con algunas limitaciones (Rubio y col. 2013; Rubio y col. 2014a; Rubio y col. 2014b). La CUS e HIG poseen diferentes propiedades químicas (pK_b, y Log P_{o/w}) que la

cocaína (COC) (Drager 2002) y, en consecuencia, la HIG y CUS, no son extraídas o si lo son, son extraídas en muy baja proporción de las hojas de coca durante el proceso de producción clandestina del clorhidrato de cocaína, razón por la cual no son detectados en las muestras de secuestro y en las muestras biológicas de quienes han consumido cocaína ilegalmente (Casale y Klein 1993; Rubio y col. 2015; Rubio y col. 2017).

Escasas son las citas bibliográficas halladas sobre el perfil metabólico y farmacocinética de la COC y de sus dos mayores metabolitos (benzoilecgonina (BE) y metilecgonina (EME)) en fluido oral (FO) de mascadores de hojas de coca o de bebedores de té de coca (Coe y col. 2018). No se han encontrado datos referentes al comportamiento de la CUS e HIG como así tampoco de otros dos alcaloides de la hoja de coca como la cinamoilcocaína (CIN) y la tropococaína (TRO) en el FO.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) establecer el perfil de los alcaloides de la hoja de coca en el FO de un voluntario que ha mascado hojas de coca y de otro que bebió té de coca. Se analizaron las concentraciones en FO de: COC y de sus dos principales metabolitos BE y EME, este último también constituyente de la hoja de coca, de CUS e HIG (propuestos como marcadores de mascado en orina y pelo) y de trCIN y TRO. 2) Determinar si la CUS e HIG son aún positivas a la concentración de *cut-off* propuesta por las guías internacionales para la COC, BE y EME en FO en casos de *Driving Under the Influence of Drug* (DUID), control de drogas de abuso en lugares laborales y otras situaciones forenses. Las guías internacionales han propuesto concentraciones para COC y BE de 15 a 20 ng/mL con propósito de *screening*, y 8 a 10 ng/mL para fines de confirmación (SAMHSA 2015; EWDTs 2015; Logan y col. 2018).

Materiales y método

Testigos, reactivos y materiales

Los testigos COC, BE, EME, cocaína- d^3 (COC- d^3), y benzoilecgonina- d^3 (BE- d^3) en concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ fueron obtenidos de Cerilliant (Round Rock, TX, USA), CUS (10 mg) fue comprada en Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). TRO y trCIN (20 mg) fue de NMI (West Lindfield, Australia). El testigo HIG no pudo ser obtenido comercialmente, por lo que la HIG fue identificada con base en su m/z (ion precursor) \rightarrow m/z (ion producto), las transiciones fueron obtenidas empleando un extracto de hojas

de coca y registrando el espectro de masa para futuras comparaciones.

Reactivos: el agua ultrapura 18 M Ωcm se obtuvo de un purificador de agua Millipore CO. (Bedford, MA, USA). El acetonitrilo, metanol y 2-propanol (LC-MS grade) se compraron a Riedel-de Haën (Seelze, Germany). El ácido fórmico (98%) fue de Panreac (Barcelona, España) y el formiato de amonio (99%) fue de Fluka (Steinheim, Germany). Insumos: los filtros para jeringa de acetato de celulosa (0,20 μm) provinieron de Labbox Labware S.L. (Barcelona, España).

Instrumentación

Las determinaciones se realizaron en un sistema 3200 Q TRAP LC/MS/MS (ABSciex, Concord, Canadá), equipado con una bomba cromatográfica binaria Flexar FX-15 UHPLC (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) y un automuestreador Flexar UHPLC (Perkin Elmer). El software empleado para el control del sistema y adquisición de datos fue Analyst 1.6 (ABSciex), el procesamiento de los datos se realizó con el software MultiQuant 2.1 (ABSciex). La columna cromatográfica usada fue *Infinity LabPoroshell 120 Hilic* (2,7 μm , 2,10 \times 100 mm) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Un GECKO 2000 se empleó para el control de la temperatura de la columna (30 a 80°C) de Amchro GmbH (Hattersheim, Germany). La fuente de iones con ionización por electrospray (ESI), fue operada en modo ionización positiva, a una temperatura de 400°C, 5000 V. La separación de los compuestos se realizó a 40°C y se empleó un gradiente con una fase móvil A de formiato de amonio 20 mM, pH 4,2 en agua ultrapura y una fase móvil B de acetonitrilo:metanol (4:1). El tiempo de corrida fue de 20 min.

En la *Tabla 1* se detallan para cada compuesto el ion precursor y los iones productos analizados, el modo MRM: *multi reaction monitoring*, los tiempos de retención, los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC). Se analizaron al menos dos iones producto para cada compuesto para garantizar la especificidad de la medida y la presencia de un analito fue confirmada cuando todos los iones cualificadores fueron identificados en cada corrida cromatográfica. La MRM transición de mayor respuesta fue empleada para la cuantificación.

Los rangos de cuantificación para COC, BE, trCIN y TRO estuvieron entre 5-200 ng/mL; entre 10-200 ng/mL para EME y para CUS entre 50-800 ng/mL. Detalles sobre la validación del método son descriptos en una publicación previa (Rubio y col. 2018) y en la *Tabla 1*.

Tabla 1. MS/MS, tiempos de retención, LC y LD de alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína en FO.

Compuesto	Ion precursor (amu)	Ion producto (amu)	ISTD	TR (min)	LD ng/mL	LC ng/mL
BE	290,1	168,2	BE-d ³	2,62	n/a	5
		105,1				
		77				
COC	304,1	182,2	COC-d ³	2,67	n/a	5
		105,1				
		82				
		77				
EME	200,1	182,2	BE-d ³	4,21	5	10
		82,1				
		67,1				
		41,1				
trCIN	330,2	77,1	BE-d ³	2,64	n/a	5
		182,1				
		103,1				
		51,1				
TRO	246,1	124,1	BE-d ³	3,75	n/a	5
		77,1				
		67,1				
		51,1				
CUS	225,1	84,1	BE-d ³	11,65	n/a	50
		42,1				
HIG ⁽¹⁾	142,1	84,1		3,53		
		42,1				
BE-d ³	293,1	171,2		2,62		
COC-d ³	307,1	185,1		2,81		
		85,1				

Amu: atomic mass unit; ISTD: internal standard; TR: tiempo de retención; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; n/a: no aplica, dato no calculado; ⁽¹⁾HIG no disponible comercialmente, los datos se obtuvieron de un extracto de hojas de coca.

Cuantificación

La cuantificación de la COC, BE, EME, CUS, trCIN y TRO fue realizada empleando un método validado siguiendo las guías internacionales (Rubio y col. 2018). Las muestras de FO fueron colectadas por salivación en un tubo de vidrio (*spitting*) (Bosker y Huesties 2009). No se emplearon colectores de FO comerciales debido a la falta de conocimientos sobre el comportamiento de la HIG y CUS sobre este tipo de dispositivos y no se encontraron datos en la bibliografía sobre este punto.

Después de la colección, la muestra de FO fue centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 10 min. Se tomaron 200 µL FO y fueron mezclados con 10 µL de una solución de estándar interno de 500 ng/mL (COC-d³ y BE-d³), se adicionaron 600 µL de fase móvil acetonitrilo: formiato de amonio 20 mM en agua, pH 4,2 (95:5) para precipitar las proteínas, se agitó por 2 min y se centrifugó (10000 rpm, 4°C, 10 min). EL sobrenadante fue filtrado (0,2 µm) y evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno (a 40°C). El extracto evaporado fue redissuelto en 100 µL de fase móvil y una alícuota de 20 µL fue inyectada en el LC-MS/MS.

Participantes

Dos voluntarios sanos participaron en este estudio, a quienes se les permitió desayunar previo a mascar hojas de coca o beber una taza de té de coca. Los voluntarios realizaron su rutina diaria mientras las muestras de FO fueron colectadas. No se consumieron bebidas alcohólicas durante el experimento. Ambos participantes dieron su consentimiento por escrito.

El primer voluntario mascó 5 g de hoja de coca junto con una sustancia alcalina (bicarbonato de sodio) durante aproximadamente 1 hora. Una muestra blanco de FO fue tomada antes de iniciar el mascado (-1,5 h), se inicia el mascado al tiempo -1,17 h, las hojas fueron removidas de la boca a tiempo 0 y las muestras de FO fueron tomadas a los 5 y 30 min y 1,0- 2,0- 3,5- 4,5- 6,0- 7,5- 9,5- 13,5- 23,0 y 26,0 h (detalle del procedimiento en la *Tabla 2*).

El segundo voluntario bebió una taza de té de coca comercial (un saquito de té de 1 g de hojas de coca picadas). Las muestras de FO fueron tomadas a -1,5 h antes (muestra blanco), 5 y 30 min, y 1,0- 2,0 y 3,0 h. después de la ingesta del té (detalles del procedimiento en la *Tabla 3*).

En todos los casos las muestras de FO fueron mantenidas a -20°C hasta el momento del análisis.

Resultados y discusión

Las concentraciones de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína en FO vs el tiempo después de mascar hojas de coca y de beber el té de coca se muestran en las *Tablas 2 y 3* y en las *Figuras 1 y 2*.

La alta concentración hallada a los 5 y 30 min. (0,08 y 0,5 h) en el FO del voluntario que mascó hojas de coca pudo deberse a la contaminación del FO por éstas o a una absorción local que produciría un efecto depósito de las drogas en la cavidad oral (Drummer 2006, Reichardt 2014).

En el FO del mascador de hojas de coca la relación BE/COC, EME/COC, y CUS/COC pasó de menor de 1 a mayor de 11, sugiriendo que la eliminación de la COC en el FO fue más rápida que en el caso de la BE, de la EME (Scheidweiler 2010) y de la CUS (*Tabla 4*). La relación BE/CUS y EME/CUS fue menor de 1 en todas las mediciones mostrando que tanto la CUS, BE y EME tienen una velocidad de eliminación semejante (*Tabla 4*).

EL alcaloide trCIN se detectó hasta las 3,5 h, mientras que la CUS, HIG, BE y EME se detectaron hasta las 13,5 h y la COC fue cuantificada hasta las 9,5 h (*Tabla 2*). La BE y EME fueron encontradas en el FO luego del consumo oral de cápsulas con 100 y 200 mg de COC (Coe y col. 2018), pero además debe tenerse en cuenta que la BE puede originarse por hidrólisis química de la COC por la acción de sustancias alcalinas como el bicarbonato de sodio que es empleado durante el coqueo y que la EME es también un alcaloide que forma parte de la hoja de coca. Los alcaloides de la hoja de coca son absorbidos durante el mascado a través de la mucosa oral (proceso que se ve favorecido por el empleo de sustancias alcalinas) y por el tracto gastrointestinal pero no han sido estimados aún el grado de absorción de los alcaloides de la hoja de coca en la cavidad oral como en el tracto gastrointestinal.

EL análisis de las relaciones CUS/COC, BE/COC y EME/COC en el segundo voluntario que bebió una taza de té de coca muestra que éstas se incrementan con el tiempo indicando al igual que en el caso de mascador de coca la eliminación de la COC es más rápida que la de la CUS, BE y EME (*Tabla 4*). Los alcaloides y metabolitos analizados son detectados/cuantificados hasta 1 h después de beber té de coca, excepto la trCIN que fue detectada solamente hasta 0,5 h (*Tabla 3*). Estos resultados muestran que beber solamente una taza de té de coca genera

Tabla 2. Concentración de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína después de mascar 5 g de hoja de coca.

		Tiempo	COC	CUS	BE	EME	CIN	HIG
		(horas)	(ng/mL)					
Tiempo de mascado de las hojas de coca	Blanco	-1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Inicio de la colocación de las hojas de coca en la boca	-1,17	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	Final de la colocación de las hojas de coca en la boca	-1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	Se remueven las hojas de coca de la boca	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Muestras de FO		0,08	1768,5 ⁽¹⁾	3151,1 ⁽¹⁾	579,8 ⁽¹⁾	1080,1 ⁽¹⁾	445,1 ⁽¹⁾	Positivo
		0,5	974,1 ⁽¹⁾	3339,1 ⁽¹⁾	324,5 ⁽¹⁾	962,8 ⁽¹⁾	396,9 ⁽¹⁾	Positivo
		1	152,5	336,4	59,6	89,8	18,7	Positivo
		2	34,8	295,1	50,5	67,1	6,6	Positivo
		3,5	41,0	322,8	75,2	223,1	10,8	Positivo
		4,5	14,4	131,7	34,1	66,2	nd	Positivo
		6	16,0	115,4	22,8	26,4	nd	Positivo
		7,5	18,6	175,3	61,4	57,1	nd	Positivo
		9,5	11,4	125,6	44,5	33,8	nd	Positivo
		13,5	nd	52,5	7,6	<10	nd	Positivo
		23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	26	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

nd: no detectable, n/a: no aplica, ⁽¹⁾sobre el límite de cuantificación**Tabla 3.** Concentración de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína después de la ingesta de una taza de té de coca.

		Tiempo	COC	CUS	BE	EME	trCIN	TRO	HIG
		(horas)	(ng/mL)						
Muestra blanco		-1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ingesta de té de coca		-0,10 a 0,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
		0,25	170,0	59,0	17,1	<10	9,1	nd	Positivo
Muestras de FO		0,50	67,8	43,7 ⁽¹⁾	10,0	<10	7,5	nd	Positivo
		1,00	19,1	39,7 ⁽¹⁾	15,3	<10	nd	nd	Positivo
		2,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	3,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

nd: no detectable, n/a: no aplica, ⁽¹⁾bajo el límite de cuantificación

Tabla 4. Relación CUS/COC, relaciones metabolitos/cocaína; relaciones metabolito/cuscohigrina; relación BE/EME en fluido oral de mascador de hojas de coca y de bebedor de té de coca.

	Tiempo (horas)	CUS/COC	BE/COC	EME/COC	BE/CUS	EME/CUS	BE/EME
Mascador hoja de coca							
	Blanco	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	0,1	1,78	0,33	0,61	0,18	0,34	0,54
	0,5	3,43	0,39	0,99	0,10	0,29	0,34
	1,0	2,21	0,39	0,59	0,18	0,27	0,66
	2,0	8,48	1,83	1,93	0,17	0,23	0,75
	3,5	7,87	1,83	5,44	0,23	0,69	0,34
	4,5	9,14	1,43	4,60	0,26	0,50	0,52
	6,0	7,21	1,43	1,65	0,20	0,23	0,86
	7,5	9,42	3,90	3,07	0,35	0,33	1,08
	9,5	11,02	3,90	2,96	0,35	0,27	1,32
	13,5	n/a	n/a	n/a	0,14	<0,2	<0,7
	23,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	26,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Bebedor de té de coca							
	Blanco	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	0,25	0,35	0,10	<0,05	0,29	<0,2	>1,7
	0,50	>0,6	0,15	<0,2	0,23	0,25	>1,0
	1,00	>2,0	0,80	<0,5	0,39	<0,25	>1,8
	2,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a: no aplica.

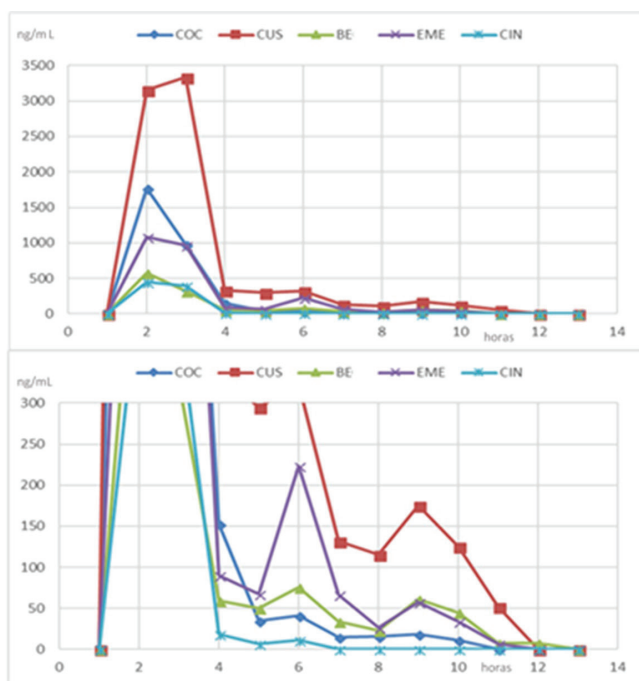


Figura 1. Perfil de concentración vs. tiempo de la COC, alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en FO, después de mascar 5 g de hoja de coca por 1 h. A dos escalas de concentración.

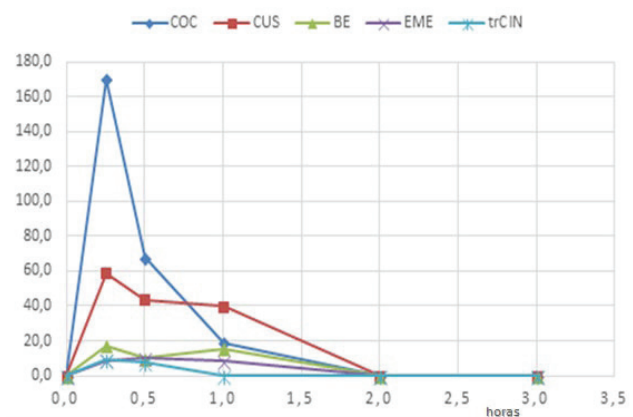


Figura 2. Perfil de concentración vs. tiempo de la COC, alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en FO, después de beber una taza de té de coca comercial.

concentraciones en FO de COC y BE por encima de los niveles de *cut-off* recomendados por SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) (8 ng/mL) hasta al menos 1 h luego de la ingesta. (SAMHSA 2015). Reichardt 2014 reportó resultados similares en su tesis: Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection.

Se halló una buena correlación entre los resultados positivos de la HIG y la CUS en todas las muestras de FO de ambos participantes (Tablas 2 y 3). Por último, la TRO uno de los alcaloides menos abundante de la hoja de coca (Moore 1995), no fue detectada en ninguna muestra de FO analizada.

Conclusión

Este estudio preliminar es uno de los primeros que aportan datos de la cinética de los alcaloides de la hoja de coca en FO luego del consumo de hojas de coca a través del mascado de hojas de coca o de la ingesta de té de coca. Los resultados obtenidos podrían estar indicando que el FO sería una muestra útil para ser empleada en los laboratorios de toxicología forense para auxiliar a la Justicia como en los accidentes producidos por manejar bajo la influencia de drogas, en los controles laborales de drogas de

abuso o en otras causas criminales. La CUS e HIG son positivas en el FO del participante que mascó hojas de coca aun cuando la COC y BE han disminuido su concentración por debajo de los valores *cut-off* propuestos por las guías internacionales con propósito de *screening* (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) (SAMHSA 2015; EWDTs 2015; Logan y col. 2018). Similar consideración es encontrada en el participante que bebió una taza de té de coca, en el cual la CUS y la HIG siguen siendo positivas hasta 1 h después de la ingesta y de la detección de la COC y BE. Por lo tanto, CUS e HIG podrían ser en FO útiles marcadores para corroborar un consumo legal y reciente de hojas de coca (mascado o ingesta de té de coca), aunque no podemos excluir que conjuntamente hubiera un consumo ilegal de cocaína. Esto es al menos una prueba para corroborar en el ámbito judicial o laboral que la persona imputada dice la verdad al alegar un consumo lícito de hojas de coca. Finalmente, y como ya se mencionó en otras secciones de este trabajo este es un estudio preliminar porque está referido a un solo voluntario en cada caso. Además, el escenario puede ser diferente en consumidores de Argentina, Perú y Bolivia quienes pueden consumir hojas de coca en variadas frecuencias diarias, sema-

nales o mensuales, pudiendo llegar a mascarse 5 a 10 g en una única vez con y sin sustancias alcalinas o en varias sesiones diarias u otras alternativas de consumo. Algunos autores han mostrado que repetidas administraciones orales cambian la relación de concentración de la COC y de sus mayores metabolitos (BE y EME) (Coe y col. 2018), en consecuencia, se requiere seguir investigando sobre este tema.

Bibliografía citada

Bosker W.M., Huestis M.A., Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. *Clin Chem.*2009; 55(11):1910–1931.

Casale J.F., Klein R.F.X. Illicit production of cocaine. *Forensic Sci Rev.*1993;5:95–107.

Coe M.A., Jufer Phipps R.A., Cone E.J., Walsh, S.L. Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology.* 2018;42:285-292.

Drager B. Review Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A.* 2002;978:1-35.

Drummer O.H. Drug testing in oral fluid, *The Clinical Biochemist Reviews.* 2006;27(3):147–159 European Workplace Drug Testing Society (EWDTs). European guidelines for workplace in oral fluid. 2015. Versión 02. [en línea]. Disponible en: <http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-oral-fluid-2015-05-29-v02.pdf>. (Consulta: 15 de enero de 2018).

InfoLEG: Información Legislativa y Documental. Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. Ley 23737. [en línea]. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=138>. (Consulta 15 de enero de 2018).

Logan B.K., D’Orazio A.L., Mohr A.L., Limoges J.F., Miles A.K., Scarneo C.E., Kerrigan, Liddicoat L.J., Scott K.S., Huestis M.A. Recommendations for Toxicological Investigation of Drug-Impaired Driving and Motor Vehicle Fatalities—2017 Update. *Journal of Analytical Toxicology.* 2018;42:63–68.

Moore J.F., Casale J.F., Fodor G., Jones A.B. Detection and Characterization of Cocaine and Related Tropane Alkaloids in Coca Leaf, Cocaine, and Biological Specimens. *Forensic Science Review.* 1995;7(2):77-101.

Reichardt E.M. (2014). Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection-Thesis Bournemouth University [en línea]. Disponible en http://eprints.bournemouth.ac.uk/21492/1/Reichardt%20CEva%20M_%20PhD_2014.pdf. (Consulta: 15 de julio de 2018).

Rubio N.C., Bermejo-Barrera P., Bermejo A., Moreda-Piñeiro A. Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology.* 2019;43:196–202.

Rubio N.C., Hastedt M., Gonzalez J., Pragst F. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *Int. J. Legal Med.* 2014b;129(1):69-84

Rubio N.C., Marquez C., Confalonieri A., Castiglione J.L. La eliminación de la higrina y cuscohygrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascadores de hoja de coca de consumidores de cocaína. Poster, TIAFT, Perú. 2015.

Rubio N.C., Strano-Rossi S., Tabernerero M.J., Anzillotti L., Chiarotti M., Bermejo A.M. Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci. Int.* 2013;227(1-3):60-3.

Rubio N.C., Strano-Rossi S., Tabernerero M.J., González J.L., Anzillotti L., Chiarotti M., Bermejo A.M. Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2014a;243:30-34

Rubio N.C., Thurmann D., Krumbiegel F., Pragst F. Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. *Drug Test and Anal.* 2017;9(2):323-326.

Scheidweiler K.B., Kolbrich Spargo E.A., Kelly T.L., Cone E.J., Barnes A.J., and Huestis M.A. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation with Plasma Concentrations following Controlled Administration. *Ther Drug Monit.* 2010;32(5):628–637.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs-oral fluid. Federal Register, 80 FR 28053- 2015 Version. Department of Health

and Human Services, [en línea]. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2015/05/15/2015-11523/mandatory-guidelines-for-federal-workplace-drug-testing-programs>. (Consulta: 15 de enero de 2018).

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

Parte 1: citas en texto

El nombre del autor y el año de publicación aparecen entre paréntesis al final de la oración:

Este reclamo fue refutado más tarde (Jones 2008).

Si el nombre del autor se menciona claramente en el texto, puede seguirse directamente por el año de publicación, entre paréntesis:

Jones (2008) luego refutó esta afirmación.

Si tanto el nombre del autor como el año se mencionan claramente en el texto, no es necesario incluir una referencia entre paréntesis:

En 2008, Jones refutó esta afirmación.

Si está citando una parte específica de un documento (por ejemplo, una cita directa o una figura, gráfico o tabla), incluya el número de página en la que se encuentra esa información:

"Estos resultados contradicen claramente los publicados en 2004 por el laboratorio Smith". (Jones 2008, p. 56).

Más de un autor

Si un documento tiene dos autores, incluya

ambos apellidos separados por "y". Para trabajos con tres o más autores, incluya solo el nombre del primer autor, seguido de "et al.":

... (Andrews y Gray 1995).
... (Gómez et al. 2003).

Múltiples obras de diferentes autores.

Si cita varias fuentes a la vez, enumérelas en orden cronológico, o alfabéticamente si se publicaron dos o más obras en el mismo año, y separe cada una con un punto y coma:

... (Samson 1963; Carter y Bowles 1975; Grimes 1975; Anderson et al. 1992).

Múltiples obras del mismo autor publicadas en el mismo año.

Si está citando dos o más obras escritas por el mismo autor en el mismo año, agregue un identificador (a, b, c...) para distinguirlas. Use los mismos identificadores en la lista de referencia:

... (Dubois 1976a; Dubois 1976b).
Dubois J. 1976a. Detección de tendencias en...
Dubois J. 1976b. Patrones de distribución de...

Citando una fuente secundaria o indirecta

Si desea citar una fuente que se cita en otro documento, siempre es mejor consultar y luego citar la fuente original. Sin embargo, si no puede localizar y verificar el documento fuente original, debe citar la fuente secundaria y al mismo tiempo reconocer al autor de la idea original tanto en la cita en el texto como en la referencia final:

... (Rawls 1971, citado en Brown 2008)
Rawls J. 1971. A Theory of Justice. Cambridge (MA): Belknap Press. Cited in: Brown PG. 2008. The Commonwealth of Life: Economics for a Flourishing Earth. 2nd ed. Montreal (QC): Black Rose Books.

Organizaciones como autores

Si el autor de un documento es una organización, corporación, departamento de gobierno, universidad, etc., use una forma abreviada de la organización en la cita en el texto, reteniendo la primera letra de cada palabra en el nombre, o alguna otra reconocida abreviatura:

... (FAO 2006).

Parte 2: lista de referencias

La lista de referencias se encuentra al final de su trabajo e incluye información bibliográfica completa de todas las fuentes citadas en el texto. Las referencias se enumeran en orden alfabético por apellido del primer autor.

Componentes de referencias en la lista de referencias.

Los siguientes componentes, si están disponibles, se incluyen al citar una fuente, en la siguiente secuencia:

Libros y otras monografías.

Autor (es) o Editor (es)
Año de publicación
Título
Contenido o designador medio
Edición
Autor (es) secundario (s)
Lugar de publicación
Editor
Paginación
Serie

Artículos de revistas y periódicos.

Autor (es)
Año de publicación
Título del artículo
Contenido o designador medio
Título de revista o periódico
Volumen
Problema
Paginación

Autor (es) o Editor (es)

Enumere los apellidos e iniciales de los autores en el orden en que aparecen en el documento original, y separe cada uno con una coma.

Mary-Beth Macdonald y Laurence G. Kaufman se convierten en Macdonald MB, Kaufman LG.

Si el documento tiene editores en lugar de autores, coloque los apellidos y las iniciales seguidos de una coma y "editor (es)":

Macdonald MB, Kaufman LG, editores.

Más de diez autores.

Incluya siempre los nombres de los primeros diez autores. Si hay más de diez, incluya solo los primeros diez nombres de autores, seguidos de una coma y "et al".

Autor (es) secundario (s)

Los autores secundarios incluyen traductores, ilustradores, editores o productores, y pueden incluirse en la referencia, además de los autores principales, después del título del libro:

Márquez GG. 1988. Amor en tiempos del cólera. Grossman E, traductor. Nueva York...

Organizaciones como autores

El nombre completo de la organización debe identificarse en la lista de referencias, pero precedido por la abreviatura utilizada en el texto, entre corchetes. Ordene la referencia alfabéticamente por el nombre completo, no por el acrónimo:

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006. Género y derecho: los derechos de las mujeres en la agricultura...

Título

Incluya tanto el título como los subtítulos, conservando la puntuación utilizada en el documento original. Para libros y títulos de artículos de revistas, escriba en mayúscula solo la primera palabra, así como los nombres propios, siglas e iniciales. Todas las palabras importantes en los títulos de las revistas pueden escribirse en mayúscula:

Libro: Cultivo de células vegetales: métodos esenciales
Revista: Canadian Journal of Animal Science

Designador de contenido

Los designadores de contenido describen el formato de un documento y pueden usarse para proporcionar información adicional con respecto a la naturaleza de un documento (por ejemplo, disertaciones, tesis, bibliografías y ciertos tipos de artículos de revistas, como editoriales, cartas al editor, noticias, etc.) Los designadores de contenido aparecen entre corchetes directamente después del título:

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [thesis]. Montreal...

Designador medio

Los designadores medios indican que el documento está en un formato no impreso, como "microfichas", "CD-ROM" o "Internet". Se re-

quieren designadores medios y aparecen entre corchetes directamente después del título:

Gooderham CB. 1917. Enfermedades de las abejas [microfichas]. Ottawa...

Lugar de publicación y editorial

El lugar de publicación se refiere a la ciudad donde se encuentra el editor. Esta información generalmente se encuentra en la portada del libro en cuestión, o en el registro del catálogo McGill. Si no se puede encontrar un lugar de publicación, use las palabras [lugar desconocido] entre corchetes. Si aparece más de una ciudad, use solo la primera que aparezca. Ciertas ciudades pueden estar solas (por ejemplo, Nueva York), pero para evitar confusiones, se puede escribir el nombre del país o incluir el código de país ISO de 2 letras (por ejemplo, Reino Unido: GB). Para ciudades canadienses o estadounidenses, se puede incluir el código de provincia o estado de dos letras.

Paginación

Si usa solo una parte de un trabajo publicado (es decir, un artículo de revista o un capítulo de libro), indique la paginación de la sección a la que se refiere. La paginación es opcional si se refiere a todo el trabajo.

Serie

Si el documento es parte de una serie, debe agregar el título de la serie y el número de volumen al final de la entrada.

Parte 3: ejemplos (impresos)

Artículo de revista

Autor (es). Año. Título del artículo. Nombre de la revista Volumen (Edición): páginas.

Holmberg S, Osterholm M, Sanger K, Cohen M. 1987. Drug-resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. New England Journal of Medicine. 311(2): 617-622.

Libro

Autor (es). Año. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial.

Carson R. 1962. Silent spring. Boston (MA): Houghton Mifflin.

Capítulo en un libro

Autor (es). Año. Título del capítulo. En: Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial.

pags. Páginas del capítulo.

Carson R. 1962. Earth's green mantle. En: Silent spring. Boston (MA): Houghton Mifflin. p. 63-83.

Libro editado

Nombre (s) del editor, editores. Año. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial.

Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. 2007. Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia. London (GB): Earthscan.

Capítulo o artículo en un libro editado

Autor (es). de la parte. Año. Título del capítulo. En: Nombre (s) del editor, editores. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial. pags. Páginas del capítulo.

Banerjee A. 2007. Joint forest management in West Bengal. In: Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia. London (GB): Earthscan. p. 221-260.

Artículo en un diccionario o enciclopedia.

Cite como lo haría un artículo en un libro editado; Si no se especifica el autor de la parte, el editor asume el lugar del autor.

Libro en serie

Autor (es). Año. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial. (Título de la serie; vol. #)

Tegos G, Mylonakis E, editors. 2012. Antimicrobial drug discovery: emerging strategies. Wallingford, Oxfordshire (GB): CABI. (Advances in molecular and cellular microbiology; vol.22).

Tesis o disertación

Autor (es). Año. Título [designador de contenido]. [Lugar de publicación]: Editorial (a menudo una universidad).

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [tesis]. [Montreal (QC)]: McGill University.

Documentos de conferencia o actas

Autor (es). Año. Título del trabajo. En: Nombre (s) del editor, editores. Título del volumen. Número y nombre de la conferencia; fecha de la

conferencia; Lugar de la conferencia. Lugar de publicación: Editorial. pags. Páginas.

Clarke A, Crame JA. 2003. Importance of historical processes in global patterns of diversity. En: Blackburn TM, Gaston KJ, editors. Macroecology: concepts and consequences. Proceedings of the 43rd annual symposium of the British Ecological Society; 2002 Apr 17-19; Birmingham. Malden (MA): Blackwell. p. 130-152.

Parte 4: ejemplos (electrónicos)

La proliferación de información electrónica ha introducido nuevos desafíos, ya que los documentos pueden existir en varios formatos diferentes. Las fuentes electrónicas se citan de la misma manera que sus contrapartes impresas, con algunos elementos específicos de Internet agregados: un designador medio (consulte la descripción anterior), la fecha en que el documento se modificó o actualizó por última vez (si está disponible), la fecha citada y el URL del documento o DOI (identificador de objeto digital). Las opiniones difieren sobre la mejor manera de citar artículos de revistas electrónicas. Generalmente, un artículo electrónico basado en una fuente impresa, en formato PDF, se considera inalterable y se cita como un artículo impreso.

Al ver artículos de revistas en línea, los enlaces que aparecen en el cuadro de dirección de su navegador pueden ser temporales y dejarán de funcionar después de unos días. Muchas bases de datos y editores proporcionarán un enlace permanente o persistente, o buscarán el DOI (identificador de objeto digital) del artículo, que a menudo aparece junto con el resto de la información de citas.

Artículo electrónico en formato PDF.

Los artículos en formato pdf, basados en una fuente impresa, pueden citarse como un artículo de revista impresa (ejemplo en la Parte 3).

Artículo electrónico en formato HTML o de texto.

Autor (es) Año. Título del artículo. Nombre de la revista [designador medio]. [fecha actualizada; fecha de cita]; Volumen (Edición): páginas (si están disponibles). Disponible en: URL o DOI

Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. 2010. Sustainable bio-

char to mitigate global climate change. Nature Communications [Internet]. [citado el 18 de agosto de 2010]; 1(Art. 56). Disponible en: <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n5/full/ncomms1053.html>

Libro electrónico

Autor (es) o Editor (es). Año. Título del libro [designador medio]. Edición. Lugar de publicación: editorial; [fecha actualizada; fecha de cita]. Disponible en: URL

Watson RR, Preedy VR, editors. 2010. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables [Internet]. Amsterdam: Academic Press; [citado el 22 de abril de 2010]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283

Artículo en un diccionario electrónico o enciclopedia.

Cita como lo harías con un artículo en un libro electrónico

Allaby M, editor. 2006. photosynthesis. In: Dictionary of Plant Sciences [Internet]. Rev. ed. Oxford: Oxford University Press; [citado el 31 de agosto de 2010]. Disponible en: www.oxfordreference.com/views/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147

Sitio web

Título del sitio web [designador medio]. Fecha de publicación. Lugar de publicación: Editorial; [fecha actualizada; fecha de cita]. Disponible en: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [actualizado al 30 de marzo de 2007; citado el 11 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.is.mcgill.ca/upo/factbook/index-upo.htm>

Documento en línea

Autor (es) Fecha de publicación. Título [designador medio]. Edición. Lugar de publicación: Editorial; [fecha actualizada; fecha de cita]. Disponible en: URL

Kruse JS. 2007. Framework for sustainable soil management: literature review and synthesis [Internet]. Ankeny (IA): Soil and Water Conservation Society; [citado el 3 de agosto de 2008]. Disponible en: <http://www.swcs.org/documents/filelibrary/BeyondLiteraturereview.pdf>

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 resolution of 300 dpi. Submit all original drawings and

photographs in glossy paper with the authors' name and figure number written in pencil in the back. For the electronic submission, photographs should be in high resolution JPEG or GIF formats. Both figures and photographs must be clearly legible. The minimum size for figures is half-letter paper size (21 x 15 cm) at 300 dpi. Magnification must be indicated whether by a scale bar or the magnification number. Present figure captions in a separate page, accordingly numbered. Only the elements visible in the corresponding figure must be included in the caption.

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

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

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

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

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

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

References.

Part 1: in-text citations

The author's name and the year of publication are listed in parentheses at the end of the sentence:

This claim was later refuted (Jones 2008).

If the author's name is clearly mentioned in the text, it can be directly followed by the year of publication, in parentheses:

Jones (2008) later refuted this claim.

If both the author name and year are clearly mentioned in the text, there is no need to include a parenthetical reference:

In 2008, Jones refuted this claim.

If you are citing a specific part of a document (e.g. a direct quotation, or a figure, chart or table), include the page number on which that information is found:

"These results clearly contradict those published in 2004 by the Smith lab." (Jones 2008, p. 56).

More than one author

If a document has two authors, include both surnames separated by "and". For works with three or more authors, include only the first author name, followed by "et al.":

... (Andrews and Gray 1995).

... (Gomez et al. 2003).

Multiple works by different authors

If you are citing several sources at once, list them in chronological order, or alphabetically if two or more works were published in the same year, and separate each one with a semicolon:

... (Samson 1963; Carter and Bowles 1975; Grimes 1975; Anderson et al. 1992).

Multiple works by the same author published in the same year

If you are citing two or more works written by the same author in the same year, add a designator (a, b, c...) to distinguish them. Use the same designators in the reference list:

... (Dubois 1976a; Dubois 1976b).

Dubois J. 1976a. Detection of trends in...

Dubois J. 1976b. Distribution patterns of...

Citing a secondary or indirect source

If you would like to cite a source that is cited in another document, it is always best to consult and then cite the original source. However, if you are unable to locate and verify the original source document, you must cite the secondary source while at the same time acknowledging the author of the original idea in both the in-text citation and end reference:

... (Rawls 1971, cited in Brown 2008)

Rawls J. 1971. A Theory of Justice. Cambridge (MA): Belknap Press. Cited in: Brown PG. 2008. The Commonwealth of Life: Economics for a Flourishing Earth. 2nd ed. Montreal (QC): Black Rose Books.

Mary-Beth Macdonald and Laurence G. Kaufman become Macdonald MB, Kaufman LG.

If the document has editors rather than authors, follow the names with a comma and “editor(s)”:

Macdonald MB, Kaufman LG, editors.

Organizations as authors

If the author of a document is an organization, corporation, government department, university, etc., use an abbreviated form of the organization in the in-text citation, by retaining the first letter of each word in the name, or some other recognized abbreviation:

... (FAO 2006).

Part 2: reference list

The reference list comes at the end of your paper and includes full bibliographic information for all of the sources cited in the text. The references are listed in alphabetical order by first author last name.

Components of references in the reference list

The following components, if available, are included when citing a source, in the following sequence:

Books and other monographs

Author(s) or Editor(s)

Year of publication

Title

Content or medium designator

Edition

Secondary author(s)

Place of Publication

Publisher

Pagination

Series

Journal and newspaper articles

Author(s)

Year of publication

Article title

Content or medium designator

Journal or newspaper title

Volume

Issue

Pagination

Author(s) or Editor(s)

List the last names and initials of the authors in the order in which they appear in the original document, and separate each one with a comma.

More than ten authors

Always include the names of the first ten authors. If there are more than ten, include the first ten author names only, followed by a comma and “et al.”

Secondary author(s)

Secondary authors include translators, illustrators, editors or producers, and may be included in the reference, in addition to the principal author(s), after the book title:

Marquez GG. 1988. Love in the time of cholera. Grossman E, translator. New York...

Organizations as authors

The full name of the organization must be identified in the reference list, but preceded by the abbreviation used in the text, in square brackets. Order the reference alphabetically by the full name, not the acronym:

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. Gender and law: Women's rights in agriculture...

Title

Include both the title and subtitle, retaining the punctuation used in the original document. For books and journal article titles, capitalize only the first word, as well as proper nouns, acronyms and initials. All significant words in journal titles may be capitalized:

Book: Plant cell culture: essential methods
Journal: Canadian Journal of Animal Science

Content designator

Content designators describe the format of a document, and may be used to provide additional information with regards to the nature of a document (e.g. dissertations, theses, bibliographies, and certain types of journal articles such as editorials, letters to the editor, news, etc.). Content designators appear in square brackets directly after the title:

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [thesis]. Montreal...

Medium designator

Medium designators indicate that the document is in a non-print format, such as “microfiche”, “CD-ROM”, or “Internet”. Medium designators are required and appear in square brackets directly after the title:

Gooderham CB. 1917. Bee diseases [microfiche]. Ottawa...

Place of publication and Publisher

The place of publication refers to the city where the publisher is located. This information is usually found on the title page of the book in question, or in the McGill catalogue record. If no place of publication can be found use the words [place unknown] in square brackets. If more than one city is listed, use only the first one that appears. Certain cities may stand alone (e.g. New York), but in order to avoid confusion, the country name may be written out or 2 letter ISO country code included (e.g. United Kingdom: GB). For Canadian or U.S. cities, the two letter province or state code may be included.

Pagination

If using only part of a published work (ie. a journal article, or a book chapter), indicate the pagination of the section you are referring to. Pagination is optional if you are referring to the entire work.

Series

If the document is part of a series, you must add the series title and volume number at the end of the entry.

Part 3: examples (print)

Journal article

Author(s). Year. Article title. Journal name. Volume(Issue): Pages.

Holmberg S, Osterholm M, Sanger K, Cohen M. 1987. Drug-resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. *New England Journal of Medicine*. 311(2): 617-622.

Book

Author(s). Year. Book Title. Edition. Place of Publication: Publisher.

Carson R. 1962. *Silent spring*. Boston (MA): Houghton Mifflin.

Chapter in a book

Author(s). Year. Chapter title. In: Book title. Edition. Place of Publication: Publisher. p. Pages of the chapter.

Carson R. 1962. Earth's green mantle. In: *Silent spring*. Boston (MA): Houghton Mifflin. p. 63-83.

Edited book

Editor name(s), editors. Year. Book title. Edition. Place of Publication: Publisher.

Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. 2007. *Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia*. London (GB): Earthscan.

Chapter or article in an edited book

Author(s) of the part. Year. Chapter title. In: Editor name(s), editors. Book title. Edition. Place of Publication: Publisher. p. Pages of the chapter.

Banerjee A. 2007. Joint forest management in West Bengal. In: Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. *Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia*. London (GB): Earthscan. p. 221-260.

Article in a dictionary or encyclopedia

Cite as you would an article in an edited book; if the author of the part is not specified, the editor assumes the place of the author.

Book in a series

Author(s). Year. Book Title. Edition. Place of Publication: Publisher. (Series title; vol. #)

Tegos G, Mylonakis E, editors. 2012. *Antimicrobial drug discovery: emerging strategies*. Wallingford, Oxfordshire (GB): CABI. (Advances in molecular and cellular microbiology; vol.22).

Thesis or dissertation

Author(s). Year. Title [content designator]. [Place of Publication]: Publisher (often a university).

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [thesis]. [Montreal (QC)]: McGill University.

Conference papers or proceedings

Author(s). Year. Title of paper. In: Editor name(s),

editors. Title of Volume. Number and name of conference; date of conference; location of conference. Place of publication: Publisher. p. Pages.

Clarke A, Crame JA. 2003. Importance of historical processes in global patterns of diversity. In: Blackburn TM, Gaston KJ, editors. Macroecology: concepts and consequences. Proceedings of the 43rd annual symposium of the British Ecological Society; 2002 Apr 17-19; Birmingham. Malden (MA): Blackwell. p. 130-152.

Part 4: examples (electronic)

The proliferation of electronic information has introduced new challenges, as documents can exist in several different formats. Electronic sources are cited in the same way as their print counterparts, with some internet-specific items added: a medium designator (see description above), the date the document was last modified or updated (if available), the date cited, and the document URL or DOI (digital object identifier)

Opinions differ on how best to cite electronic journal articles. Generally, an electronic article based on a print source, in PDF format, is considered unalterable and is cited like a print article would be. Electronic articles in html or text format could easily be altered or exist in several versions, and should be cited respecting the rules for websites and other electronic documents.

When viewing journal articles online, the links that appear in your browser's address box may be temporary and will no longer work after a few days. Many databases and publishers will provide a permanent or persistent link, or, look for the article's DOI (digital object identifier), which is often listed along with the rest of the citation information.

Electronic article in PDF format

Articles in pdf format, based on a print source, can be cited like a print journal article (example in Part 3).

Electronic article in HTML or text format

Author(s). Year. Article title. Journal name [medium designator]. [date updated; date cited]; Volume(Issue): Pages (*if available*). Available from: URL or DOI

Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. Nature Communications [Internet]. [cited 2010 Aug 18]; 1(Art. 56). Available from: <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n5/full/ncomms1053.html>

Electronic book

Author(s) or Editor(s). Year. Book Title [medium designator]. Edition. Place of Publication: Publisher; [date updated; date cited]. Available from: URL

Watson RR, Preedy VR, editors. 2010. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables [Internet]. Amsterdam: Academic Press; [cited 2010 Apr 22]. Available from: www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283

Article in an electronic dictionary or encyclopedia

Cite as you would an article in an electronic book

Allaby M, editor. 2006. photosynthesis. In: Dictionary of Plant Sciences [Internet]. Rev. ed. Oxford: Oxford University Press; [cited 2010 Aug 31]. Available from: www.oxfordreference.com/views/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147

Website

Title of website [medium designator]. Date of publication. Place of publication: Publisher; [date updated; date cited]. Available from: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [updated 2007 Mar 30; cited 2013 Jan 11]. Available from: <http://www.is.mcgill.ca/upo/factbook/index-upo.htm>

Online document

Author(s). Date of publication. Title [medium designator]. Edition. Place of publication: Publisher; [date updated; date cited]. Available from: URL

Kruse JS. 2007. Framework for sustainable soil management: literature review and synthesis [Internet]. Ankeny (IA): Soil and Water Conservation Society; [cited 2008 Aug 3]. Available from: <http://www.swcs.org/documents/filelibrary/BeyondLiteraturereview.pdf>