

# *Acta Toxicológica Argentina*

---

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 30  
N° 3  
Diciembre 2022

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

Sergio A. Saracco

#### Vicepresidente

Silvia Cortese

#### Secretaria

Horacio Trapassi

#### Tesorera

Jorge Zavatti

#### Vocales

Julieta Soledad Borello

Fernanda Simoniello

Patricia Lucero

#### Vocales suplentes

Ignacio Gallo

Gabriela Fiorenza

Alicia Loteste

#### Comité científico

Ricardo Fernández

Edda Villamil Lepori

Valentina Olmos

Susana García

Adriana Silvia Ridolfi

#### Tribunal de honor

José A. Castro

Marta Carballo

Elda Carngel

### 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, Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental.*

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.*

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

#### Comité de apoyo

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

Laura C. Lanari, *INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".*

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

Julio A. Navoni, *Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.*

#### 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)

Notas editoriales .....	133
<b>Artículos Originales</b>	
Aplicación de modelos metabolómicos para la identificación de EPOC en poblaciones expuestas a humo de leña en una comunidad indígena de México. <i>Balderas Segura, Berenice; Flores Ramírez, Rogelio; Díaz de León-Martínez, Lorena; Galván Romero, Vanessa S; Rodríguez Aguilar, Maribel.</i> .....	135
Evaluación de la exposición a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, salud renal y respiratoria en población indígena de Toco, San Antonio, S.L.P., México <i>Martínez-Castillo, Marco Antonio; Flores-Ramírez, Rogelio; Rodríguez-Aguilar, Maribel; Meléndez-Marmolejo, Jessica<sup>1</sup>; Sarahí Galván- Romero, Vanessa<sup>1</sup>; Díaz de León-Martínez, Lorena.</i> .....	143
Validação da espécie <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> como organismo teste de água doce em estudos ecotoxicológicos para avaliação de fármacos utilizados no tratamento da COVID-19 <i>de Andrade Barbosa, Andreza Miranda; da Silva, José Custódio; dos Santos Mendonça Oliveira, Jaisa Marília; Alejandro Navoni, Julio.</i> .....	156
Ensaio de toxicidade para avaliação de águas superficiais estuarinas usando <i>Nitocra</i> sp. como organismo-teste alternativo <i>dos Santos Mendonça, Jaisa Marília; Navoni, Julio Alejandro; de Medeiros, Guilherme Fulgêncio; Pinto Mina, Isabel Maria.</i> .....	163
Caracterización y biomonitorio de contaminantes orgánicos e inorgánicos en una zona ladrillera de San Luis Potosí <i>Berumen-Rodríguez, Alejandra; Rodríguez Torres, Israel; Díaz de León-Martínez, Lorena; Díaz-Barriga, Fernando; Flores Ramírez, Rogelio.</i> .....	177
Instrucciones para los autores .....	186

Los resúmenes de los artículos publicados en Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en la base de datos LILACS, en la dirección literatura científica del sitio [www.bireme.br](http://www.bireme.br)

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

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

## **Notas editoriales**

---

**Por Aldo Sergio Saracco, Presidente de la Asociación Toxicológica Argentina y Adolfo Rafael de Roodt, Director de Acta Toxicológica Argentina.**

Acta Toxicológica Argentina es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina (ATA), entidad multidisciplinaria sin fines de lucro, que nuclea a los profesionales que están vinculados directa o indirectamente al estudio, desarrollo, investigación, aplicación y divulgación de la toxicología. Y que tiene dentro de sus objetivos la publicación de trabajos relacionados con los muy variados campos de la toxicología.

Es por ello, que en este número, por decisión de la Comisión Directiva de ATA y el Comité Editorial de Acta Toxicológica Argentina, cumpliendo con el mandato de mantener vinculaciones con otras asociaciones y entidades científicas del país y del extranjero, se decidió incluir en el número 30(3) una selección de los trabajos premiados que fueran presentados en el I Congreso Virtual Iberoamericano de Salud Ambiental, realizado en noviembre de 2021 y organizado en forma conjunta por la Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental (SIBSA), la Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA), la Sociedade Portuguesa de Saúde Ambiental (SPSA) y el Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN) de Brasil; todas instituciones afines y vinculadas con las actividades que ATA lleva adelante, y que con su actividad buscan difundir la adquisición, utilización y progreso del conocimiento toxicológico y el perfeccionamiento de la enseñanza de las distintas áreas de la Toxicología. Es por ello, que Acta Toxicológica Argentina dedica este número a la publicación de los trabajos que abordan diferentes temas relacionados con la toxicología ambiental.

**Por Susana I. García, Presidenta de la Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental (SIBSA) y miembro del Comité Editorial de Acta Toxicológica Argentina.**

Este número de Acta Toxicológica Argentina será dedicado a temas de toxicología ambiental, y para ello realizamos una selección entre los trabajos premiados que fueran presentados como comunicaciones libres en el I Congreso Virtual Iberoamericano de Salud Ambiental, realizado en noviembre de 2021, organizado en forma conjunta por la Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental (SIBSA), la Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA), la Sociedade Portuguesa de Saúde Ambiental (SPSA) y el Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN) de Brasil.

La Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental (SIBSA) se fundó el 26 de septiembre de 2017, día mundial de la salud ambiental, como una entidad que agrupa a las sociedades y a los profesionales y técnicos de todos los países de la región de Iberoamérica, dedicados a disminuir los riesgos que sobre la salud deriven de los determinantes ambientales reconocidos, con la finalidad de propiciar las relaciones de colaboración e intercambio científico entre sus miembros para apoyar el cumplimiento de sus programas y objetivos.

Agradecemos a Acta Toxicológica Argentina por ser una de las revistas que oficia como órgano oficial de difusión de SIBSA.

En más de veinte sesiones, que tuvieron lugar del 8 al 12 de Noviembre, se ha asegurado el diálogo con más de cien investigadores y especialistas de elevado perfil de excelencia, con amplia trayectoria en áreas de transdisciplinas vinculadas a la Salud Ambiental en Iberoamérica y al cumplimiento de los objetivos de la Agenda 2030.

Se recorrieron temas de Biomonitorio ambiental, Cambio climático y salud, Contaminación atmosférica, Contaminación natural (HACRE, radiactividad), Disruptores endocrinos, Enfermedades desatendidas y control de vectores, Enseñanza y profesionalización en salud ambiental, Epidemiología ambiental, Farmacontaminación, Género y salud ambiental, Gobernanza en salud ambiental, Innovación en salud ambiental, Inspecciones en Salud Ambiental, Manejo de residuos, Microbiología ambiental, Nuevas amenazas en salud ambiental, Productos tecnológicos en salud ambiental, Psicología ambiental comunitaria, Salud ambiental infantil, Salud ambiental y COVID, Seguridad química y Sitios contaminados.

La participación de referentes de Centros Colaboradores de la Oficina Sanitaria Panamericana y de la Organización Mundial de la Salud redundaron como principal beneficio en la revisión de los temas a la luz de las estrategias que se desarrollan globalmente en la materia.

Trabajos originales, innovaciones metodológicas, así como de evaluación y/o monitoreo, quedaron expresados en las comunicaciones libres en formato VIDEO que están disponibles para toda la comunidad de la salud ambiental, en el canal YouTube de SIBSA.

Todas las sesiones quedaron grabadas y pueden visualizarse en el canal YouTube de SIBSA (<https://www.youtube.com/c/SibsaSaludAmbiental/playlists>).

Los mejores trabajos en cada área fueron premiados, como una manera de alentar a seguir esforzándose en esa dirección, en un acto que se realizó el 10 de diciembre, Día Internacional de los Derechos Humanos, contando con las palabras del Sr. David Boyd, Relator Especial del Alto Comisionado de la ONU sobre Derechos Humanos y Medio Ambiente, cuyo tema central fue “El Derecho a un Ambiente Sano es finalmente un Derecho Humano. Que sea una herramienta para el cambio, ahora es un asunto de todos”.

Finalmente, invitamos a todos los interesados a repasar las conferencias, las sesiones temáticas, las presentaciones de trabajos libres, y animamos a los colegas a reunirse por país, por región, a debatir los problemas de salud ambiental a nivel local y a aprovechar la internacionalización y las experiencias de profesionalización en salud ambiental que ofrece este gran espacio de intercambio que es la Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental abierta a todos. En tal sentido, en marzo de 2022, SIBSA Argentina tuvo su Primera Reunión Nacional donde se revisaron los grandes temas vistos en el Congreso a la luz de la realidad del país y en breve también se publicarán las conclusiones y los lineamientos de trabajo surgidos en dicha reunión.

Visítanos en [www.saludambiental.org](http://www.saludambiental.org) donde encontrarás cómo seguirnos en las redes y en <https://www.youtube.com/c/SibsaSaludAmbiental/playlists>.

## ARTÍCULOS ORIGINALES

---

### Aplicación de modelos metabolómicos para la identificación de EPOC en poblaciones expuestas a humo de leña en una comunidad indígena de México. Application of metabolomic models for the identification of COPD in populations exposed to wood smoke in an indigenous community in Mexico.

Balderas Segura, Berenice<sup>1</sup>; Flores Ramírez, Rogelio<sup>2</sup>; Díaz de León-Martínez, Lorena<sup>2</sup>; Galván Romero, Vanessa S<sup>2</sup>; Rodríguez Aguilar, Maribel\*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, UASLP. <sup>3</sup>División de Ciencias de la Salud, UQROO. \*Teléfono: (52-983) 835 03 00 ext 529; Dirección: Avenida Erick Paolo S/N Magisterial, CP 77039, México.

\*maribel.rodriguez@uqroo.edu.mx

Recibido: 27/04/2022

Aceptado: 15/06/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Resumen.** Propósito: Para la evaluación metabólica de la fisiopatología pulmonar se utiliza principalmente el aliento exhalado, el cual ha tomado una gran relevancia como método de diagnóstico no invasivo, de bajo costo, rápido y seguro. El objetivo del presente estudio fue aplicar modelos metabolómicos para la identificación de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en población vulnerable expuesta a la quema de biomasa en una comunidad indígena de México. Métodos: El estudio se conformó por 142 participantes, 44 pacientes con EPOC asociado a la quema de biomasa, 60 controles y 38 población indígena expuesta a la quema de biomasa (PIE). Las muestras de aliento exhalado se analizaron mediante una nariz electrónica (HERACLES II, Alpha MOS). Con los datos obtenidos se realizó un Análisis Canónico de Coordenadas principales (CAP), que fue utilizado para la predicción de EPOC de la PIE y se determinó la concentración de 1-hidroxipireno (1-OHP) en muestras de orina. Resultados: Se logró identificar un total 59 COVs en las muestras de aliento exhalado de los grupos de estudio, los cuales se utilizaron para establecer un modelo de discriminación entre la huella química del grupo de pacientes con EPOC y el grupo control. El modelo CAP indicó una separación entre las huellas químicas de los pacientes con EPOC y sujetos sanos, con una correcta predicción de 91,34%, con una sensibilidad y especificidad de 93,2 y 96,7% respectivamente. Se encontraron 10 participantes de la PIE con patrón obstructivo y una alta concentración de 1-OHP, determinando que existe una concentración del  $1,31 \pm 0,67 \mu\text{g/mol}$  de creatinina. Esta concentración se encuentra más de 5 veces arriba de los valores de referencia establecidos en el 2001, que es de  $0,24 \mu\text{g/mol}$  de creatinina. Al comparar los resultados de la huella química de la PIE se posicionó en el grupo de EPOC. Conclusión: Se logró obtener un diagnóstico oportuno en población vulnerable mediante el uso de la metabolómica y se demostró la exposición y los efectos pulmonares en población indígena de San Luis Potosí.

**Palabras clave:** EPOC; Metabolómica; Biomasa.

**Abstract.** Purpose: to evaluate metabolic disorders of the pathophysiology of the lung, the exhaled breath is mainly used, this has become highly relevant as a non-invasive, low-cost, fast and safe diagnostic method. The objective of this study is to apply metabolomic models for the identification of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in a vulnerable population exposed to biomass burning in an indigenous community in Mexico. Methods: The study consisted of 142 participants, 44 patients with COPD associated with biomass burning, 60 controls and 38 indigenous population exposed to biomass burning (PIE). Exhaled breath samples were analyzed using an electronic nose (HERACLES II, Alpha MOS). With the data obtained, a Canonical Analysis of Principal Coordinates (CAP) was performed, which was used for the prediction of COPD of IEP and the concentration of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in urine samples was determined. Results: A total of 59 VOCs were identified in the exhaled breath samples of the study groups, which were used to establish a discrimination model between the chemical fingerprint of the COPD patient group and the control group. The CAP model indicated a separation between the chemical fingerprints of COPD patients and healthy subjects, with a correct prediction of 91,34%, with a sensitivity and specificity of 93,2 and 96,7%, respectively. 10 IEP participants with an obstructive pattern and a high concentration of 1-OHP were found, determining that there is a concentration of  $1,31 \pm 0,67 \mu\text{g/mol}$  of creatinine. This concentration is more than 5 times above the reference values established in

2001, which is 0,24 µg/mol of creatinine. When comparing the results of the chemical fingerprint of the PIE, it was positioned in the COPD group. Conclusion: It was possible to obtain an opportune diagnosis in a vulnerable population using metabolomics and exposure and pulmonary effects were demonstrated in the indigenous population of San Luis Potosí.

**Key words:** COPD; Metabolomics; Biomass.

## Introducción

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se constituye por la disminución del calibre de la pared bronquial (bronquitis crónica), y la destrucción alveolar (enfisema pulmonar) con agrandamiento de los espacios aéreos, dificultando la respiración. A pesar de ser una enfermedad prevenible y tratable, actualmente se encuentra dentro de las primeras cuatro causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Martínez Luna *et al.* 2020; McDonald y Khor 2013).

Dentro de los principales factores de riesgo causantes de la EPOC, el más frecuente es el tabaquismo. No obstante, la exposición prolongada a ciertos polvos en el trabajo, químicos y aire contaminado en ambientes cerrados y abiertos puede contribuir a la enfermedad (Alhamdow *et al.* 2021). En este sentido en países en vías de desarrollo, la exposición al humo de leña es también causa de dichos padecimientos siendo el tiempo de exposición un factor determinante en la severidad de la enfermedad (GIFCOL 2018; Acuña *et al.* 2012; Kaldman *et al.* 2003).

El humo de leña o biomasa se compone de monóxido de carbono, óxido nítrico y sulfúrico, benceno, aldehídos, y partículas de materia respirables PM10 y PM2.5 (WHO 2005; Zhang y Smith 2003), estas partículas se pueden inhalar fácilmente y atravesar la barrera pulmonar entrando al sistema sanguíneo causando efectos dañinos en otros órganos (Juneman 2007). Estudios de la Organización Mundial de la Salud indican que las mujeres con exposición intensa al humo doméstico son tres veces más vulnerables de padecer EPOC y dos veces más a padecer cáncer pulmonar que aquellas que utilizan combustibles más limpios. En este sentido, el impacto a nivel mundial por la quema de leña en el interior de las viviendas está relacionado con 1.6 millones de muertes. Asimismo, existen más de 28 millones de hogares distribuidos en la república mexicana, que utilizan leña para la cocción de los alimentos y satisfacer sus necesidades energéticas básicas (Callejón-Leblic *et al.* 2019), lo que indica la magnitud de la población expuesta y la necesidad de contar con técnicas de detección temprana de enfermedades pulmonares.

Al respecto, la prueba para el diagnóstico de la EPOC es la espirometría, indicando la limitación al flujo aéreo (obstrucción) que persiste después de la administración de un broncodilatador. Esta prueba debe realizarse por equipo y personal especializado, aumentando los costos, por lo que la EPOC permanece subdiagnosticada, no sólo en los estadios tempranos, sino también en los tardíos. La búsqueda de biomarcadores para un diagnóstico temprano de la inflamación crónica de las vías respiratorias en la EPOC presenta perfiles celulares y moleculares distintos a los encontrados en una persona sana. La metabolómica puede permitir la evaluación de perfiles moleculares globales para ser utilizados como biomarcadores, lo que resulta en una huella química específica de la enfermedad (GIFCOL 2018; McDonald y Khor 2013).

Para evaluar desordenes metabólicos de la fisiopatología del pulmón se ha utilizado principalmente el aliento exhalado Rodríguez-Aguilar *et al.* (2019). Este ha tomado una gran relevancia como método de diagnóstico no invasivo, de bajo costo, rápido y seguro. Como el estudio realizado por Rodríguez *et al.* en 2020, donde analizaron el aliento exhalado de 116 pacientes con EPOC (88 asociado a tabaquismo y 28 a quema de biomasa) y 178 sujetos clínicamente sanos, por medio de la nariz electrónica Cyranose 320, logrando encontrar una huella química que separa los pacientes con EPOC de los sujetos sanos, indicando que existen diferentes Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) presentes en el aliento exhalado que pueden contribuir como biomarcadores en la detección de la enfermedad. Asimismo, demostraron que la separación de la huella química está asociada a la enfermedad y no a la causalidad (Rodríguez-Aguilar *et al.* 2020).

Por lo tanto, el objetivo de la investigación es aplicar modelos metabolómicos para la identificación de la EPOC en población vulnerable expuesta a la quema de biomasa determinado por la concentración del metabolito de 1-hidroxipireno en una comunidad indígena de México.

## Materiales y Métodos

**Selección de participantes para el estudio.** Se realizó un muestreo de aliento exhalado a 142



participantes: 44 pacientes con EPOC asociado a la quema de biomasa, 60 controles y 38 participantes de la población indígena expuesta a la quema de biomasa (PIE).

**Aprobación del estudio.** El estudio contó con la aprobación del comité de bioética e investigación del Hospital Central “Ignacio Morones Prieto”, con número 23-16.

**Criterios de inclusión.** Los criterios de inclusión para los tres grupos de estudio (Grupo control, Grupo de pacientes con EPOC y Grupo PIE) fueron los siguientes: I) Contar con una espirometría actual y una valoración médica, II) Contestar cuestionario para conocer su estado de salud, III) Firmar el consentimiento informado, IV) El grupo de PIE haber vivido siempre en la zona Indígena (Tocoy, San Antonio, S.L.P.) y contestar el cuestionario para determinar el nivel de exposición.

**Prueba de función pulmonar.** Se realizó una prueba de espirometría a todos los participantes antes y después de la administración de 200 µg de salbutamol, siguiendo las pautas de los estándares American ATS/ERS (American Thoracic Society/ European Respiratory Society) (Alhmdow *et al.* 2021). Los valores normales predichos fueron los establecidos para la población mexicoamericana a partir del estudio NHANES III (Lareau 2019). La respuesta significativa al broncodilatador se definió como un aumento del Volumen Espiratorio Forzado al primer segundo (FEV1) en la prueba post broncodilatador igual o superior a 200ml (12%). Se determinaron los valores de FEV1 y Capacidad Vital Forzada (FVC) y su relación después de la prueba broncodilatadora. La gravedad de la limitación del flujo de aire (patrón obstructivo) se calificó de acuerdo con las categorías GOLD (Koo *et al.* 2014).

**Obtención de muestras.** Las muestras de aliento exhalado se tomaron en bolsas Tedlar de 1L previamente purgadas con nitrógeno, por duplicado en los tres grupos de estudio, bajo criterios estandarizados (ayuno de 8 horas, realizando enjuague bucal con agua y sin toma de medicamentos). Al grupo PIE se les pidió muestra de orina para la determinación de 1-hidroxipireno indicando la exposición a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs). Todas las muestras se transportaron a 4°C y se almacenaron a -40°C hasta su análisis.

**Análisis metabólico del aliento exhalado**  
Se utilizó un cromatógrafo de gases ultrarrápido con

detector de nariz electrónica modelo HERACLES II (Alpha MOS) el cual cuenta con dos columnas de diferentes polaridades, dos detectores de ionización por flama (MXT-5-FID1 y MXT-1701-FID2) y una trampa de pre-concentración para aumentar la sensibilidad de la respuesta de los metabolitos. La caracterización de los compuestos químicos se basó en los índices de Kovats. De cada bolsa se tomó una muestra de 40 mL de aliento en un vial herméticamente sellado, posteriormente se incubó durante 900s a una temperatura de 40°C con una agitación de 500 rpm, y se inyectó por la técnica de espacio de cabeza en el cromatógrafo de gases con detector de nariz electrónica.

#### Quantificación de 1-hidroxipireno (1-OHP)

Es un metabolito del benzo (a)pirenocompuesto representativo de los HAPs en muestras de orina. Para cuantificación de 1-OHP se utilizó un HPLC Agilent 1260 con detector de fluorescencia.

#### Análisis estadístico

Se realizaron análisis multivariados (Análisis canónico de las coordenadas principales-CAP) para encontrar los ejes a través de la nube de datos euclidianos que da una mayor separación entre grupos predefinidos (EPOC vs Control). Se realizaron curvas ROC para determinar la especificidad y sensibilidad diagnóstica. Además, se utilizó el CAP como método de tamizaje para determinar de la PIE aquellas huellas químicas que se parecen a la de los pacientes con EPOC.

#### Resultados

El estudio se conformó por 142 participantes, de los cuales 44 presentan EPOC asociado a la quema de biomasa (Edad:  $68,41 \pm 6,88$  años;  $FEV1=54,6 \pm 13,45$ ;  $FEV1/FCV=58,10 \pm 9,82$ ) de los cuales 56,81% eran mujeres y 43,18% hombres con una exposición de  $229,5 \pm 68,53$  horas/leña, 60 sujetos sin afecciones pulmonares que conforman el grupo control (Edad= 6 años,  $FEV1= 89,35 \pm 9,73$ ,  $FEV1/FCV=84,12 \pm 4,90$ ) de los cuales 66,7% eran mujeres y 33,3% hombres y 38 pertenecen al grupo de Población Indígena Expuesta a la quema de biomasa (PIE) (Edad=  $52,5 \pm 7,18$  años;  $FEV1= 82,93 \pm 16,7$ ;  $FEV1/FCV= 78 \pm 5,27$ ) de los cuales 71,1% eran mujeres y 28,9% hombres.

Se identificaron un total 59 compuestos orgánicos volátiles (COVs) en las muestras de aliento exhalado de los grupos de estudio, los cuales se utilizaron para establecer un modelo de discriminación entre la huella química del grupo de pacientes con EPOC y el grupo control. Al respecto, nuestros resultados concuerdan con Rodríguez

et al. (2019, 2020) y Dragonieri et. al. (2009), ya que el CAP logró la separación del grupo de pacientes con EPOC de los sujetos sanos con una

$r^2=0,80$  indicando la asociación del eje CAP1 con los COVs, con un 91,34% de una correcta clasificación (Figura 1).

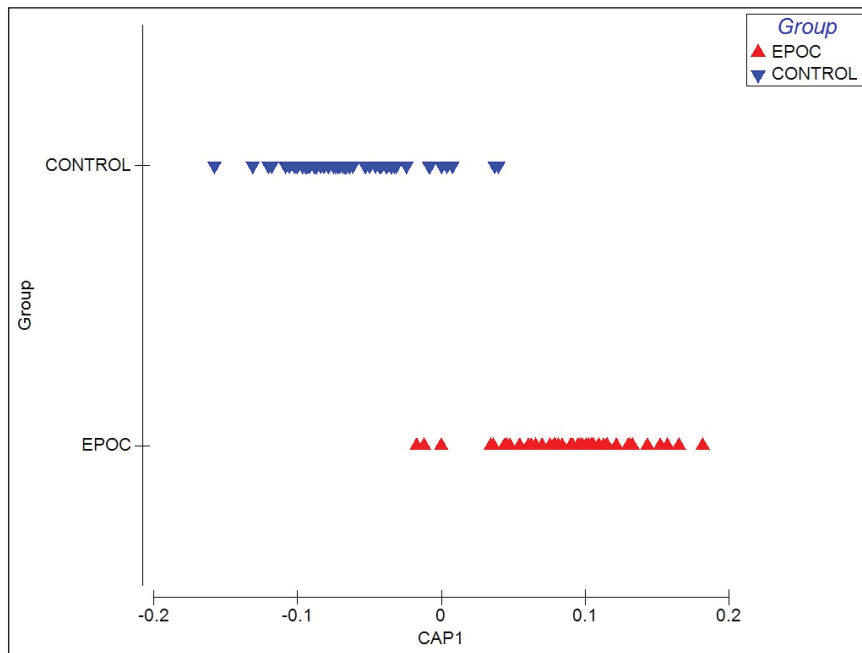


Figura 1. Análisis Canónico de Coordenadas Principales de pacientes con EPOC vs Sanos.

Con los valores obtenidos de la huella química del modelo del CAP a través del eje CAP1, se estableció el punto de corte de 0,021, el cual proporcionó una sensibilidad de 93,2% (IC 84,1-98,9%) y una especificidad del 96,7% (IC 90-100%), con

un área bajo la curva de 0,89 a través de la curva ROC. Asimismo, se obtuvo un box-plot donde se observa el comportamiento de las huellas químicas de cada paciente, así como el punto de corte obtenido en la curva ROC (Figura 2).

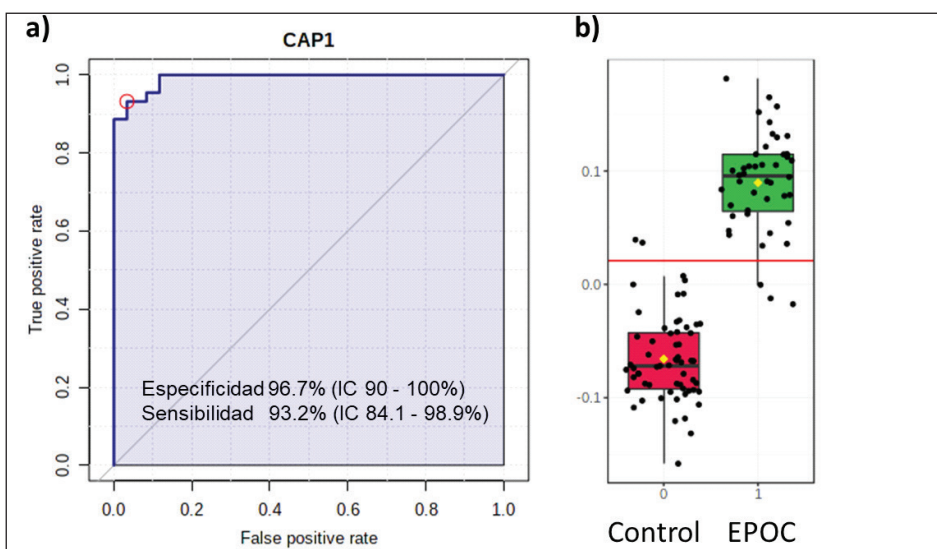
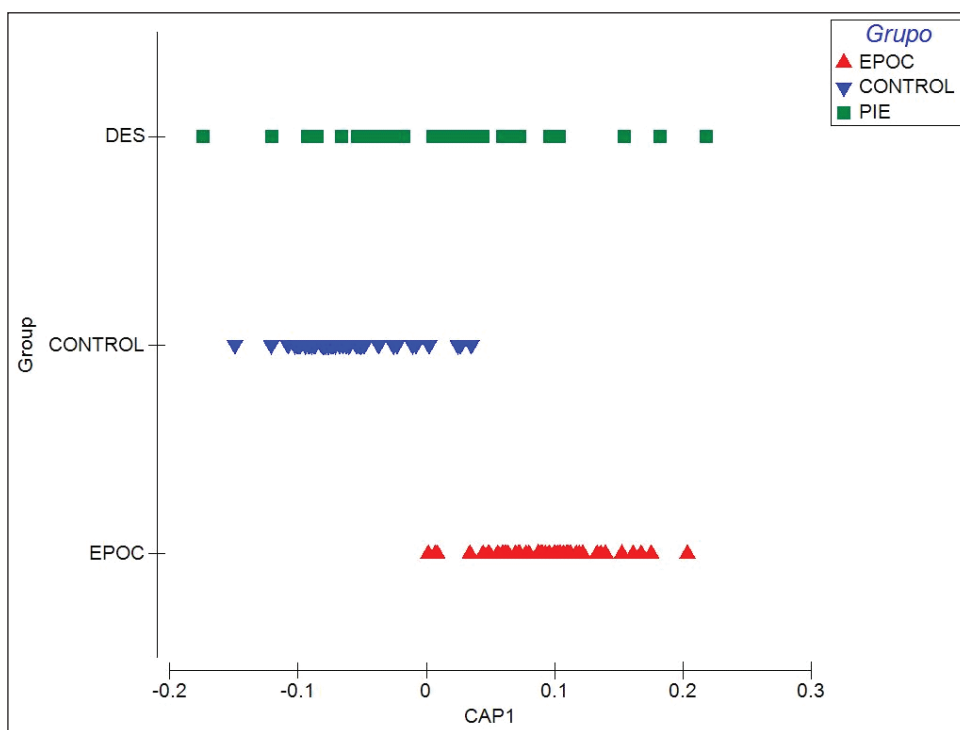


Figura 2. Gráficos de evaluación de la sensibilidad y especificidad obtenida en el modelo realizado con muestras de aliento exhalado. a) Curva ROC con un intervalo de confianza del 95%. b) Box-plot de la distribución de las muestras en el eje CAP1 de pacientes con EPOC y CONTROL, indicando con una línea de color rojo el punto de corte donde se obtiene la mejor relación entre la sensibilidad y especificidad.

Los metabolitos encontrados en los PIE permitieron identificar mediante la huella química la predicción de 17 participantes con alto riesgo de padecer EPOC en base al modelo CAP obtenido

de EPOC (Figura 3). Asimismo, se determinó el nivel de exposición a HAPs por medio de la determinación de 1-hidroxipiereno de cada participante del PIE y la función pulmonar por medio del espirómetro (Tabla1).



**Figura 3.** CAP de pacientes con EPOC vs Sanos con Predicción de población indígena expuesta (PIE) a la quema de biomasa.

**Tabla 1.** Determinaciones de la exposición y función pulmonar de la PIE.

Determinación	PIE (Población Indígena Expuesta)	Referencia
1-OHP	1,31 ± 0,67 µg/mol de creatinina	0,24 µg/mol de creatinina*
FEV1 (%)	81,6 ± 17,3	> 80**
FEV1/FVC	0,78 ± 0,05	> 0,7**

(\*Jongeneelen 2001; \*\* Guía GOLD 2020)

## Discusión

En el presente estudio se demostró la utilidad de la nariz electrónica para identificar la huella química del aliento exhalado de pacientes con EPOC y sujetos sanos. La principal aportación de nuestro estudio se basa en el uso de un modelo de predicción de EPOC, utilizado en población vulnerable expuesta a la quema de biomasa. Las evaluaciones más estudiadas de las huellas químicas en el aliento exhalado se han realizado en pacientes con enfermedades respiratorias

principalmente cáncer de pulmón y EPOC. En este sentido, un estudio de Poli *et al.* (2005) mostró una discriminación entre las huellas químicas de pacientes con cáncer de pulmón del 72,2% (n=36) y del 82,7% para pacientes con EPOC (n=25) con una sensibilidad y especificidad del 72 y 93,6% respectivamente, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Poli *et al.* 2005). Asimismo Jareño *et al.* en el 2016, observaron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre el

grupo de pacientes con EPOC y el grupo control, además de que no encontraron relación entre la detección de COVs con la edad y el género, lo que concuerda con nuestros resultados.

En un estudio de Chen *et al.* (2013), analizaron los COVs presentes en el aliento exhalado de 18 pacientes con EPOC y 10 controles de la misma edad y características biométricas, el estudio de los patrones de COVs permitió reconocer correctamente a todos los pacientes con EPOC y a 8 de 10 de los controles, lo que representaba una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92% en el diagnóstico de la enfermedad, en comparación con nuestro estudio se conformó por 142 participantes, de los cuales 44 presentaban EPOC asociado a la quema de biomasa, 60 sujetos sin afecciones pulmonares que conforman el grupo control, el modelo CAP indicó una separación entre las huellas químicas de un mayor número de pacientes con EPOC y sujetos sanos, obteniendo una correcta predicción de 91,34%, con una sensibilidad y especificidad de 93,2 y 96,7% respectivamente. Asimismo, se logró establecer un modelo de discriminación entre la huella química del grupo de pacientes con EPOC y el grupo control.

Donaire *et al.* (2005), estudiaron 12 pacientes con agudizaciones de la EPOC (AEPOC), 18 pacientes con EPOC estable y 10 controles con función pulmonar normal, los resultados del estudio de los patrones de COVs permitió reconocer correctamente 11 de 12 de los pacientes con AEPOC (91%), 18 de los 18 pacientes con EPOC (100%) y 8 de 10 de los controles (80%). En los casos donde no se pudo reconocer ningún patrón de COVs (8%), el sujeto era fumador activo, en nuestros resultados pudimos observar que los metabolitos encontrados en la PIE (38 participantes que pertenecían al grupo de Población Indígena Expuesta a la quema de biomasa) permitieron identificar mediante la huella química la predicción de 17 participantes con alto riesgo de padecer EPOC, asimismo, la evaluación pulmonar mediante espirometría indicó que 10 de los participantes tenían un nivel de obstrucción leve y moderado, mientras que 4 de los 17 participantes con huella metabólica característica de un paciente con EPOC tenía un bajo FEV1 y FVC sin aun ser obstructivo. Los últimos 3 participantes no fue concluyente su espirometría. Estos datos se obtuvieron en varias sesiones de la prueba espirométrica, ya que la prueba fue compleja para poder tener resultados valorables además de la diferencia de lenguaje que no lograron realizar las maniobras de una

manera eficiente.

En cuanto a la exposición de las poblaciones indígena a los HAPs se evaluó la concentración del metabolito de 1-hidroxipireno (1-OHP), determinando que existe una concentración del  $1,31 \pm 0,67 \mu\text{g/mol}$  de creatinina. Esta concentración se encuentra más de 5 veces arriba de los valores de referencia establecidos en el 2001, que es de  $0,24 \mu\text{g/mol}$  de creatinina. No obstante, no se encontró una correlación significativa entre los valores espirométricos (FEV1, FEV1/FVC) y la concentración de 1-OHP determinadas, por lo que indica que este metabolito no está asociado a la EPOC. Sin embargo, se sugiere identificar otros metabolitos de los HAPs como el fenantreno que se ha sugerido que tiene esta asociación inversa con el daño pulmonar (Zelikoff *et al.* 2002).

### Conclusión

Se demostró la exposición y efecto por neurotóxicos en población indígena de San Luis Potosí. Se logró obtener un diagnóstico oportuno en población vulnerable mediante el uso de la metabolómica, además se estableció una huella química de los pacientes con EPOC y sujetos sanos. Demostrando así, que los COVs encontrados en el aliento exhalado están relacionados con el estrés oxidativo que producen estas enfermedades, incluyendo aquellos que se producen para contrarrestar el efecto, así como, el incremento de ciertas enzimas específicas de la enfermedad. Sin embargo, se consideró que se necesita incrementar el número de participantes para obtener una huella metabolómica más compleja y de mayor certidumbre, finalmente se considera que ésta huella metabolómica puede ser utilizada como monitoreo de la enfermedad en sujetos en riesgo (fumadores, población expuesta a neurotóxicos, entre otros).

Agradecimientos. Los autores agradecen la contribución de la investigación a todos los participantes de la comunidad de Tocooy, San Antonio, S.L.P

### Bibliografía

Acuña Kaldman M, Canizales Cobos M, Chanona Alcocer O, Domínguez Flores ME, Domínguez Peregrina A, Galindo Galindo JO, García Guillén MdeL, Loustaunau Andrade MA. 2003. Segundo consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la EPOC. Edición especial del INER y de la Sociedad Mexicana de Neumología y Cirugía de Tórax. p. 9-13.

Alhmdow A, Zettergren A, Kull I, Hallberg J, An-

dersson N, Ekström S, Berglund M, Wheelock CE, Essig YJ, Kraiss AM, *et al.* 2021. Chen S , Wang Y, Choi S. 2013. Applications and Technology of Electronic Nose for Clinical Diagnosis. *Open Journal of Applied Biosensor*. 2: 39-50. doi: 10.4236/ojab.2013.22005. Low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is associated with reduced lung function among Swedish young adults. *Environ Res*. 197:111169. doi:10.1016/j.envres.2021.111169

Callejón-Leblic B, Pereira-Vega A, Vázquez-Gandullo E, Sánchez-Ramos JL, Gómez-Ariza JL, García-Barrera T. 2019. Study of the metabolomic relationship between lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease based on direct infusion mass spectrometry. *Biochimie*. 157:111-122. doi:10.1016/j.biochi.2018.11.007

Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratú P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. 2009. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer*. 64(2):166-170. doi:10.1016/j.lungcan.2008.08.008

Dragonieri S, Quaranta VN, Carratu P, Ranieri T, Resta O. 2016. Exhaled breath profiling in patients with COPD and OSA overlap syndrome: a pilot study. *J Breath Res*. 10(4):041001. doi:10.1088/1752-7155/10/4/041001

[G.I.F.C.O L] Global initiative for chronic lung Disease. 2018. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. [https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov\\_WMS.pdf](https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov_WMS.pdf)

Juneman A, Legarreta G. 2007. Inhalación de humo de leña: una causa relevante pero poco reconocida de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Revista Americana de Medicina Respiratoria*. 7(2):21-57 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382138370004>

Koo I, Shi X, Kim S, Zhang X. 2014. iMatch2: compound identification using retention index for analysis of gas chromatography-mass spectrometry data. *J Chromatogr A*. 1337:202-210. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.049

Lareau SC, Fahy B, Meek P, Wang A. 2019. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med*. 199(1):P1-P2. doi: 10.1164/

rccm.1991P1

Martínez Luna M, Rojas Granados A, Lázaro Pacheco RI, Meza Alvarado JE, Ubaldo Reyes L, Castellanos AM. 2020. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Bases para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 63(3): 28-35.

McDonald CF, Khor Y. 2013. Advances in chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Med J*. 43(8):854-862. doi:10.1111/imj.12219

Pizzini A, Filipiak W, Wille J, Ager C, Wiesenhofer H, Kubinec R, Blaško J, Tschurtschenthaler C, Mayhew CA, Weiss G, Bellmann-Weiler R. 2018. Analysis of volatile organic compounds in the breath of patients with stable or acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Breath Res*. 12(3):036002. doi: 10.1088/1752-7163/aaa4c5

Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, Mutti A. 2005. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res*. 6:71. doi:10.1186/1465-9921-6-71

Rodríguez-Aguilar M, Díaz de León-Martínez L, Gorocica-Rosete P, Domínguez-Reyes C.A, Martínez-Bustos V, Tenorio-Torres J.A, Flores-Ramírez R. 2020. Identification of profiles of volatile organic compounds in exhaled breath by means of an electronic nose as a proposal for a screening method for breast cancer: a case-control study. *J Breath Res*. 14:046009. <http://dx.doi.org/10.1088/1752-7163/aba83f>.

Rodríguez-Aguilar M, Ramírez-García S, Ilizaliturri-Hernández C, Gómez-Gómez A, Van-Brussel E, Díaz-Barriga F, Flores-Ramírez R. 2019. Ultrafast gas chromatography coupled to electronic nose to identify volatile biomarkers in exhaled breath from chronic obstructive pulmonary disease patients: A pilot study. *Biomed Chromatogr*. 33(12):e4684. doi:10.1002/bmc.4684

[WHO] World Health Organization 2005. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: Summary of risk assessment. Global Update. Offset Publication, WHO, Geneva.

Zelikoff JT, Chen LC, Cohen MD, Schlesinger RB. 2002. The toxicology of inhaled woodsmoke. *J*

Toxicol Environ Health B Crit Rev. 5(3):269-282.  
doi:10.1080/10937400290070062

Zhang J, Smith KR. 2003. Indoor air pollution: a global health concern. Br Med Bull. 68:209-225.  
doi:10.1093/bmb/ldg029.

**Evaluación de la exposición a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, salud renal y respiratoria en población indígena de Toco, San Antonio, S.L.P., México**  
**Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, renal and respiratory health in the indigenous population of Toco, San Antonio, S.L.P, México.**

Martínez-Castillo, Marco Antonio<sup>1</sup>; Flores-Ramírez, Rogelio<sup>2</sup>; Rodríguez-Aguilar, Maribel<sup>3</sup>; Meléndez-Marmolejo, Jessica<sup>1</sup>; Sarahí Galván- Romero, Vanessa<sup>1</sup>; Díaz de León-Martínez, Lorena<sup>4\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud (CIAAS), CIACYT, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2ª Sección, C.P 78210. <sup>2</sup>CONACYT, investigador. Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología (CIACYT), Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Sierra Leona #550, Col. Lomas 2ª Sección, C.P 78210. <sup>3</sup>Departamento de Farmacia, Ciencias de la Salud, Universidad de Quintana Roo, Quintana Roo. <sup>4</sup>Lorena Díaz de León Martínez; Institute of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Ulm University, 89081 Ulm, Germany; Phone number: +49 176 85903109

\*[lorena.diaz-de-leon@uni-ulm.de](mailto:lorena.diaz-de-leon@uni-ulm.de)

Recibido 27/04/2022

Aceptado 08/06/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Abstract.** Interior air pollution is a public health concern, it affects about 2.6 billion people around the world who still cook using solid fuels such as wood, crop wastes, among others. This exposition increases the risk of the development of non-communicable diseases (NCDs). The indigenous population is very susceptible to being exposed to mixtures of pollutants from the wood smoke such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) due to traditional methods of cooking, heating and waste burning. Therefore, the objective of this work was to evaluate the exposure to PAHs through the application of 10 hydroxylated metabolites (OH-PAHs) in the urine of the indigenous population from the Huasteca Potosina, this by gas chromatography coupled to mass spectrometry and to assess renal health of the population at the time of the study, with a general test of urine and through the uremic toxin Indoxyl Sulfate (IS), this by high-performance liquid chromatography, and the and pulmonary health with spirometry. The results indicate the presence OH-PAHs in 89.47% of the urine samples, the most frequent metabolites were 1-OH-PYRENE, 2-OH-NAPHTHALENE. IS was present in 100% of the samples in mean concentrations of  $193.4 \pm 91.85 \mu\text{g/L}$ . For pulmonary health, the results indicate some subjects have regular and irregular respiratory patterns. These results indicate that the population is highly exposed to a mixture of pollutants in the air that might damage the lungs and kidneys and increase the risk of NCDs development.

**Keywords:** Indoor Air Pollution; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Respiratory Health; Kidney Health; Indigenous Population.

**Resumen.** La contaminación del aire interior es un problema de salud pública, ya que afecta a unos 2.600 millones de personas en todo el mundo que siguen cocinando con combustibles sólidos como la madera, los residuos de las cosechas, etc. Esta exposición aumenta el factor de riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas. La población indígena es muy susceptible a estar expuesta a mezclas de contaminantes del humo de leña como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) debido a los métodos tradicionales de cocción. El objetivo de este trabajo fue evaluar la exposición a HAPs por medio de 10 metabolitos hidroxilados en orina de la población indígena de la Huasteca Potosina, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; por otro lado, la salud renal y pulmonar fueron evaluadas con una prueba general de orina y la toxina urémica Indoxil sulfato, esta fue evaluada por medio cromatografía líquida de alto rendimiento, y la función pulmonar con una espirometría. Los resultados indican la presencia de metabolitos hidroxilados en el 89,47% de las muestras de orina, los más frecuentes fueron el 1-OH-PIRENO, el 1, 2-OH-NAFTALENO. El Indoxil sulfato se presentó en el 100% de las muestras y la media era de  $193,4 \pm 91,85 \mu\text{g/L}$ . En cuanto a la salud pulmonar, los resultados indican que algunos sujetos presentan patrones respiratorios regulares e irregulares. Estos resultados indican que la población se encuentra expuesta de manera crónica a una mezcla de contaminantes en el aire que podría producir el desarrollo de daño en los pulmones y los riñones y aumentar el riesgo al desarrollo de enfermedades crónicas.

**Palabras clave:** Contaminación del Aire Interior; Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos; Salud Respiratoria; Salud Renal; Población Indígena.

## Introduction

The air pollution is one of the major issues for the Climate Change due to pollutants such as Carbon (CO), Methane (CH<sub>4</sub>), water vapor (H<sub>2</sub>O), among others, that have the potential to increase the global Temperature (Pan-American Health Organization PAHO) 2016; United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC) 2018). Nevertheless, this is not the only problem, the different components in the air such as Particulate Matter 10 and 2.5 (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>), have the potential to generate adverse effects on the health of humans and other organisms. The World Health Organization (WHO) estimates nine out of ten people breathe polluted air (Singh *et al.* 2018; WHO 2018). The result is that each year between 6.5 and 7 million people around the world die due to air pollution exterior and indoor air pollution, this is estimated to increase by 20% in coming years (Singh *et al.* 2018; Flores-Ramirez *et al.* 2021b). Chronic exposure to pollutants in the air increases the risk of the development of non-communicable diseases (NCDs) such as Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), lung cancer, and cardiovascular diseases. Now is reported a relationship between exposure to environmental pollutants in the air with the development and increased incidence of various diseases such as renal, lungs and cardiovascular diseases (Flores-Ramirez *et al.* 2021b), and different clinical and epidemiological studies have demonstrated that the acute and chronic exposure to air pollution can increase the mortality of cardiovascular and respiratory diseases (Fiordelisi *et al.* 2017). The 24% of diseases around the world and 23% of mortality global is a consequence of environmental factors such as air, water or food pollution; this is proof of the role that the environment plays in people's health. (WHO, 2006; Prüss-Üstün *et al.* 2016; Alamo-Hernández *et al.* 2019). For example, many deaths concerning COPD appear in low and middle-income countries, and the principal risk factors are smoking, occupational environments, ozone, passive smoking and household air pollution from solid fuels (Rodríguez-Aguilar *et al.*, 2020). Nonetheless, not everyone is in the same conditions, there are populations more susceptible to the effects of pollution environments, socio and economic conditions, one of these populations are the indigenous people. Only in the region of Latin America and the Caribbean is estimated the indigenous population was around 42 million people in 2015 (Berumen-Rodríguez *et al.* 2021; Flores-Ramirez 2021a). Those populations are often vulnerable to different environmental, social

and economic situations that affect their health; for example, these communities are frequently ubicated in places away from cities, which results in fewer opportunities, the education levels are less in comparison with cities, this cause that many youngers have to work as soon as they finish high school or even before, most of these jobs are precarious and many times these communities have social margination. On the other hand, their environments are often polluted by mycotoxigenic fungi, pathogens, heavy metals in soil or water, or pollutants due to traditional methods of cooking that can cause adverse health effects; furthermore, in these communities access to health centers is limited, and even in the best cases, they only receive basic cares. The mixture of these factors cause a risk for the health, development and for their life quality (Suleyman *et al.* 2018; Díaz de León-Martínez *et al.* 2020a; Díaz de León-Martínez *et al.* 2020b; Flores-Ramirez *et al.* 2021a).

One of the main issues related to NCDs as mentioned before is exposure to polluted air. Cooking by using solid fuels like wood is reported to cause chronic exposure to PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub>, carbon monoxide, nitrogen and sulfur oxides, but also organic pollutants such as benzene, phenols, formaldehyde, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Pruneda-Álvarez *et al.* 2012; Cincinelli y Matellini 2017; Flores-Ramirez *et al.* 2021b). The latter, are multiple aromatic rings bounded, those containing up to four rings are called "light" and four or more rings are called "heavy" which are more stable and toxic than light ones (Chen *et al.* 2019; Díaz de León-Martínez *et al.* 2021a). PAHs are bound in different structural configurations. They can be transferred long distances in Particulate Matter are considered global pollutants because they have the potential to produce carcinogenic and teratogenic effects (Sarigiannis *et al.* 2015; Alegbeleye *et al.* 2017; Chen *et al.* 2019). They are liberated into the environment from natural and anthropogenic sources such as traffic, domestic heating, oil refining, industrial processes, incomplete combustion of solid fuels (Kim *et al.* 2013; Tavera *et al.* 2018; Ciao *et al.* 2020; Ferhat *et al.* 2020). PAHs present different pathways of exposure, inhalation of smoke, ingestion of contaminated food, and dermical absorption (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR) 2016; Díaz de León-Martínez *et al.* 2021b). Due to their toxic effects and their persistence in the environment PAHs have been classified by the US EPA and European Commission as priority pollutants. Even though, there are around 100 mixtures of



PAHs these agencies have prioritized 16 of them, which are reported to cause mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity effects (Drwal *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2019). Because PAHs are highly lipophilic, they have the potential to cross the cellular membrane easily and accumulate in fat or other tissue. They are metabolized by cytochrome p450 enzymes and epoxide hydrolase, after, these reactions cause epoxides, dihydrodiol phenols and quinones which are conjugated with glucuronide and sulfate, furthermore, these products will be eliminated by urine. However, on the other hand, they can produce a toxic effect due to PAHs metabolites making covalent attachment with the DNA that result in mutagenesis and therefore, cancer (Cao *et al.* 2019; Rodríguez-Aguilar *et al.* 2019). There are known effects of exposure to PAHs in the lungs, cardiovascular diseases, neurotoxicity, however, recent research has associated a significant burden of renal damage associated with the exposure to these pollutants (Pérez-Maldonado *et al.* 2018; Ciao *et al.* 2020; Flores-Ramirez *et al.* 2021b). The International Agency for Research on Cancer (IARC 2010) listed one of them, the Benzo (a) pyrene in group 1, as a carcinogen to humans. The biomonitoring of these pollutants is frequently carried out in working environments due to occupational exposure, nevertheless, the indigenous populations are also susceptible to suffering from the exposure to these pollutants and hence their toxicity. For indigenous people, the main exposure route is through smoke inhalation for wood burning to cook garbage burning and the consumption of polluted foods (Flores-Ramirez *et al.* 2021b). Only in Mexico, about 27 million people depend on biomass burning especially wood to cook and heat their homes, using traditional open fires which causes chronic exposure; moreover, most of these people are concentrated in rural indigenous communities (Riojas-Rodríguez *et al.* 2011). For the biomonitoring of PAHs, the quantification of hydroxylated metabolites is usually applied, 1-OH-Pyrene (1-OH-PYR) excreted in urine is frequently used as the best biological indicator of exposure to PAHs, nevertheless, the use of more excreted products has gained relevance in recent years, because using more metabolites permits a better estimation of exposure.

Indoxyl sulfate (IS) is a small molecule (213 g/mol). It is a uremic toxin that is bound to at least 90% of plasma proteins (Leong and Sirich 2016; Tan *et al.* 2017). There are clinical studies that support that IS could contribute to the diagnosis of Chronic Kidney Disease (CKD), in this disease, there are uremic products, which tend to accumu-

late in the blood due to loss of kidneys function to correctly eliminate these toxins. For this reason, uremic toxins like IS are proposed as biomarkers of kidney damage (Barreto *et al.* 2009; Villaseñor and Martínez y Martínez 2013). Several authors reported in different clinical studies, that IS may contribute to abnormalities in cardiovascular diseases, this uremic toxin is capable to stimulate oxidative stress and also multiple NADPH oxidase signalling pathways; for this reason, IS could help in the diagnostics of renal damage and even a relation with cardiovascular diseases (Gao and Liu, 2017; Szu-Chun *et al.* 2017; Tan *et al.* 2017; Xiong and Leong 2019). CKD still affects many people around the world, in México, only in 2019 this disease caused 72, 539 deaths (8.43% of the total deaths that year in Mexico) one of the leading causes of mortality due to NCDs in the country according to data of the Global Burden Disease (IHME 2019).

For pulmonary assessment, spirometry is a technique that by using a spirometer predicts how is the respiratory capacity of a person. This test gives different values after a person is tested, these values can be interpreted, so in this form to know if the patient has normal or abnormal respiratory health, so, the spirometry helps to estimate the risk of lung cancer, COPD, cognitive impairment, cardiovascular or other causes of obstruction in the respiratory tract (Coates *et al.* 2013; García-Río *et al.* 2013).

It is important to propose new strategies to assess the diagnosis and monitoring of renal and pulmonary disease, which must be accurate and easily implemented in remote locations such as rural communities, where access to health services is limited and environmental pollution is high, therefore, the main objective of this work was the evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through 10 hydroxylated metabolites of PAHs (1-hydroxynaphtalene (1-OH-NAP) and 2 hydroxynaphtalene (2-OH-NAP); 2-, 3-, and 9- hydroxyfluorene (2-OH-FLU, 3-OH-FLU, 9-OH-FLU); 1-, 2-, 3-, and 4-, hydroxyphenanthrene (1-OH-PHE, 2-OH-PHE, 3-OH-PHE, 4-OH-PHE) and 1-hydroxypyrene (1-OH-PYR), also, the evaluation of the renal health through the biomarker Indoxyl Sulfate and the respiratory health through spirometry.

## Material and methods

### 2.1 Population and study design.

This study was conducted in the community of Tocoy, located in San Antonio, at the Huasteca Potosina, San Luis Potosí, México (21° 38' 19" N and 98° 52' 15" W). The average climate is warm

and humid, with an annual temperature of around 24°C. There are 1061 habitants approximately of indigenous Tenek origin; this community has been described with high levels of marginalization (Díaz de León-Martínez *et al.* 2020a)

A transversal study was conducted in November 2019, the ethical protocol was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine of the Autonomous University of San Luis Potosi (CEI-2018-002). An open invitation was extended to the population with the following inclusion criteria: i) older than 30 years old; ii) residence of over 3 years at the site (community); iii) signatures of informed consent; iv) No kidneys disease at the time of the study; v) No recent urinary infections; vi) No medication before sample collection. Meanwhile, the exclusion criteria were: i) insufficient sample and ii) Not having signed the informed consent form. The participants received and answered a questionnaire about topics such as socio-demographic characteristics, general health, family history of chronic diseases and dietary habits, to identify risk habits of exposure and other risks habits or situations that might apply in the exposition of PAHs (e.g. smokers at home, use of firewood and hours per year in front of this, burning garbage, among others).

## 2.2 Determination of hydroxylated metabolites in urine.

The urine samples were collected from the first micturition in the morning in sterile polypropylene-50 mL glasses after the samples were transported at 4°C and stored at 80°C until analysis. The determination of hydroxylated metabolites in urine was conducted based on the method established by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) with slight modifications. Ten metabolites were determined: 1-, 2-OH-NAP; 2-, 3-, 9-OH-FLU, 1-, 2-, 3- y 4-OH-PHE y 1-OH-PYR. First, 5 mL of each of the samples of urine were filtered through a PVDF membrane. Subsequently, enzymatic hydrolysis of 2 mL of sample was performed. For this, 20 µL of the enzyme β-glucuronidase/arylsulfatase was added (Merck, Millipore, EE. UU) 2 mL of 1 M acetate buffer at pH 5.5 and the samples were incubated at 37°C for 17 h under constant conditions. After this incubation a liquid-liquid extraction was performed in duplicate with an 80:20 (V:V) solution of pentane and toluene evaporated with a gentle stream of nitrogen gas (N) at 45°C until the desired volume of 10 µL was reached, after that, 10 µL of N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (derivatizing agent) (Merck Millipore, Massachusetts, USA) and 2.5 µL

of internal standard <sup>13</sup>C<sub>6</sub> 1-OH-PYR (Cambridge Isotopes Laboratories) at 25 ng/ml by calibrating the solution to 100 µL with toluene. Finally, the solution was subjected to a derivatization process at 60°C for 30 min. Samples and calibration curves were analyzed by gas chromatography (GC) (Agilent 6890) coupled to a mass detector (MS) (Agilent 5975) in electron impact ionization (EI) mode. The injection port was operated in splitless mode, with a temperature of 270°C using helium as a carrier gas at a pressure of 36 psi at a constant flow rate of 0.9 ml/min. The chromatographic separation was performed using a 30 m X 0.25 mm X 0.25 µm HP 5 MS column (Agilent®). The oven setting conditions were as follows: 95°C (1 min), 195°C (15°C/min) 206°C (2°C/ min) until minute 13.2, followed by an increase to 320°C (40°C/min) and hold until minute 24 with a total run time of 24 min. The parameters under which the detector was operated are described below: emission of 35 µA and energy, 69.9 V. SCAN mode (50-500 m/z) was used to identify the compound and the identification and quantification ions were selected for SIM mode. The identification fragment ions were for 1-OH-NAP and 2-OH-NAP 201 and 216 m/z; for 2-OH-FLU and 9-OH-FLU 253 and 254 m/z respectively for 3-OH-FLU 253, 254 and 255 m/z; for 1-OH-PHE, 2-OH-PHE, 3-OH-PHE and 4-OH-PHE 251 and 266 m/z and 1-OH-PYR 290 and 291 m/z and the internal standard <sup>13</sup>C<sub>6</sub> 1-OH-PYR 281 and 296 m/z. The results were obtained and processed with Chemstation software (Agilent®).

## 2.3 Determination of Indoxyl Sulfate (IS) in plasma.

The determination of IS was performed with slight modifications to the methodology described by Barreto *et al.* (2009) and Xiong and Kwang (2019). The plasma samples were stored at -80°C until their subsequent analysis; briefly, the samples were thawed for approximately 15-20 min. 100 µL of the sample were then taken and deposited in 2.5 mL, then 150 µL of distilled water were added and 900 µL of ice-cold acetonitrile were added to extract the IS; after that, the samples were shaken vigorously for 30 seconds and then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at a temperature of 5°C. From the supernatant, a 2 mL aliquot was extracted and finally, the samples were filtered for further processing in the liquid chromatography. The parameters evaluated for the validation of the method were: Correlation coefficient (0.99); the slope was of (0.079); the limit of detection was 0.01 ppm and the limit of quantification was 0.05 ppm respectively. For reproducibility, it was

obtained from 5.1 to 17.9 with repeatability from 0.36 to 25.6, with which it was possible to obtain a confidence interval of 95%.

#### 2.4. Lung function test

For the pulmonary function assessment, spirometry was performed before and after administration of 200 mg of salbutamol, following the guidelines of the ATS/ERS standards. A spirometer (EasyOne® plus) was used. Spirometry was performed by a professional certified by the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) who complied with ATS/ERS standards. The predicted normal values were those of the Mexican-American population of the NHANES III study and the predictions of the equations described by Perez-Padilla in the platinum project (Latin American Project for the Investigation of Pulmonary Obstruction) were also used. Measurements included were: Forced expiratory volume in one second (FEV1); Forced Vital Capacity (FVC); and the ratio of the two volumes (FEV1/FVC). The alterations in these spirometric parameters indicate restrictive and obstructive patterns according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2019, the results were classified as normal breathing patterns, mild restriction, moderate restriction and severe restriction.

### 3.0 Results

#### 3.1 Characteristics of the study of population

There were 19 participants, of whom 16 were women (84.21%) and 3 were men (15.79%). Table 1 "Population characteristics" shows the general anthropometric characteristics and risk activities of the population studied in this research. The anthropometric characteristics of the study participants are presented below. The average age was  $52.09 \pm 7.18$  years; the average weight was  $60.81 \pm 10.34$  Kg. The average height was  $1.49 \pm 0.053$  m. The average body fat percentage was  $38.69 \pm 7.98\%$ . The Body Mass Index (BMI) was  $27.03 \pm 3.694$  (CDC, 2015); 12 people (63.15%) presented overweight, 3 people (15.79%) were in a state of obesity, and only 4 (21.05%) were within normal weight values. All study participants reported spending more than 8 hours in front of the stove for cooking and food consumption activities. None of the women reported being pregnant or breastfeeding. Regarding comorbidities, 3 people reported high blood pressure, 5 had type 2 diabetes mellitus. 100% of the participants reported using firewood during childhood and in the present, so there is chronic exposure, as well as burning garbage.

**Table 1.** Population Characteristics.

Parameters	Mean $\pm$ Standard Deviation
Subjects	<i>N</i> = 19
Gender	
Women	16
Men	3
Age (years)	$52 \pm 7$ .
Anthropometric measurements	
Weight (Kg)	$60.81 \pm 10.34$
Height (m)	$1.49 \pm 0.053$
IMC (Kg/ m <sup>2</sup> )	$27.03 \pm 3.694$
Normal weight	21.05%
Overweight	63.15%
Obesity	15.79%
Risk Activities	
% Cooking with solid fuels	100%
% Garbage burning	100%
% Active smokers	0%
% Passive smokers	0%

#### 3.2 Evaluation of hydroxylated metabolites in urine samples

The data of the results were analyzed by descriptive statistics using the "GraphPad Prism" program. The retention times (TR) obtained for each of the OH-PAHs were  $TR \pm 0.2$  min. The  $TR= 7.6$  min for 1-OH-NAP;  $TR=7.9$  for 2-OH-NAP;  $TR= 12.3$  min for 9-OH-FLU;  $TR=12.5$  min for 3-OH-FLU;  $TR=12.9$  min for 2-OH-FLU;  $TR=14.8$  min for 4-OH-PHE;  $TR= 16. 5$  for 3-OH-PHE;  $TR= 16.7$ min for 1-OH-PHE;  $17.6$  min for 2-OH-PHE; and  $TR= 23.2$  min for 1-OH-PYR and <sup>13</sup>C<sub>6</sub> 1-OH-PYR (Díaz de León-Martínez *et al.* 2021a).

A descriptive statistical analysis was performed where all the hydroxylated metabolites of each sample were summed for better analysis. The mean concentration of Total Hydroxylated Metabolites ( $\Sigma$ -OH-HAPs) in urine was  $6.44 \pm 9.79$   $\mu$ mol/ mol of creatinine. Hydroxylated metabolites were found in 89.47% of the samples analyzed. Of the PAHs analyzed in the study population, the most frequently found hydroxylated metabolite was 1-OH-PYR which was present in 84.21% of the samples, followed by 1-OH-NAP and 2-OH-NAP which were present in 68.42% and 63.15% of the samples, respectively. Regarding the other metabolites, 4-OH-PHE was found in 31.57% of the samples, 3-OH-FLU was present in only 2 samples, while 3-OH-PHE and 1-OH-PHE were found in only one sample each; 2-OH FLU, 2-OH-

PHE was not detected in any of the samples analyzed. The reference values were taken from the guideline of Jongeneelen, 2001 which has three levels, nevertheless, these reference values are just for the excretion of 1-OH-PYR in urine. *Table 2 "Results of PAHs in the population"* shows the metabolites detected in the samples collected, as well as the percentages and levels obtained. The first reference value is the excretion of 1-OH-PYR for 0.24  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine for non-smokers and 0.74  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine for smokers; in the second level, with excretion of 1.4  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine, in this level genotoxic effects starts to

appears in workers; for the third level there is two population: coke oven workers with 2.3  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine and 4.9  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine for the primary aluminium industry. The mean of 0.33  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine, exceeds the first reference value, however, the mean does not exceed the second level of Guideline PAHs. The highest value of 1-OH-PYR did not exceed the second reference value either, because the value was 1.11  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine. On the other hand, 1-OH-NAP was present in 68.42% of samples with a mean of 2.52  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine, the 2-OH-NAP was present in 63.15% of samples, with a mean of 2.16  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine

**Table 2.** Results of OH-PAHs in the population.

Metabolite	# of samples in which the metabolite was detected	% of samples with the metabolite analyzed	Mean metabolite in total population ( $\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	Minimum Value	Maximum Value
1 OH-NAP	13	68.42%	2.52	0.81	7.56
2-OH-NAP	12	63.15%	2.16	0.80	5.38
9-OH-FLU	1	5.26%	0.22	2.46	2.46
3-OH-FLU	2	10.52%	0.08	0.67	0.92
2-OH-FLU	ND	ND	ND	ND	ND
4-OH-PHE	6	31.57%	0.20	0.29	0.91
3-OH-PHE	1	5.26%	0.03	0.63	0.63
1-OH-PHE	1	5.26%	0.02	0.46	0.46
2-OH-PHE	ND	ND	ND	ND	ND
1-OH-PYR	16	84.21%	0.33	0.031	1.11
$\Sigma$ -OH-HAPs	17	89.47%	6.44	0.29	7.56

ND= Non Detectable

### 3.3. Renal and Respiratory health

For the renal health assessment, the mean concentrations for IS were  $193.4 \pm 91.85 \mu\text{g/L}$ . There are no reference values for this biomarker, so it is not possible to determine exactly the severity of renal damage, so the results of other studies are compared. The 3 men who participated in the study obtained concentrations below the mean. The women obtained concentrations above this value, except for one woman, who had  $65.55 \mu\text{g/L}$ . The respiratory evaluation was performed utilizing a spirometer EasyOne® Plus. The alteration in spirometric values can indicate restrictive and obstructive respiratory patterns. Of the 19 participants in the study, 9 obtained non-assessable spirometry, 5 showed normal respiratory patterns,

2 were mildly obstructive and 2 were moderately obstructive, 0 were severely restrictive and 1 was below the lower limit, none of them showed obstructive patterns.

### 4. Discussion

The results of this study indicated the study population is highly exposed to a mixture of different PAHs because 89.47% of the population presented detectable levels of one or more hydroxylated metabolites. The metabolite that was in more percentage of the population was 1-OH-PYR 84.21%, then 1-OH-NAP 68.42%; 2-OH-NAP 63.15%; 4-OH-PHE 31.57%; 3-OH-FLU 10.52%; 9-OH-FLU; 3, 1-OH-PHE 5.26%; on the other hand, 2-OH-FLU and 2-OH-PHE were not detectable to be pres-

ent in any of the samples. However, the means were different as 1-OH-NAP obtained a mean in the total population of 2.52  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine, 2-OH-NAP with a mean of 2.16  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine; 1-OH-PYR 0.33  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine; 4-OH-PHE 0.20  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine; 9-OH-FLU  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine; 3-OH-FLU 0.08  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine; 3-OH-PHE 0.03  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine and 1-OH-PHE 0.02  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine. The results were compared with the reference levels proposed by (Jongeneelen 2001). The mean 1-OH-PYR of 0.33  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine and the maximum value of 1.11  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine exceed Jongeneelen's first reference level of 0.24  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine; however, they did not exceed the second level of 1.4  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine which is when biological effects are observed. However, the presence of different hydroxylated metabolites depends on the presence of PAHs in the smoke to which the person is exposed (Díaz de León-Martínez *et al.* 2021b). The results show that the population is not only exposed to this pollutant because the samples also presented detectable levels of 1-OH-NAP with a mean of 2.52  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine; 2-OH-NAP with a mean of 2.16  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine; 9- and 3-OH-FLU with means of 0.12 and 0.08  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine respectively; 4-, 3-, 1-OH-PHE with means of 0.20, 0.03 and 0.02  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine respectively, so the use of a battery of hydroxylated metabolites allows a better estimation of exposure to more pollutants since if only 1-OH-PYR were used as a marker of exposure, the other metabolites would not be taken into account, which as the results show. The presence of these metabolites is demonstrated by the results and allows a better estimation of the pollutants that in these communities are mainly due to the burning of solid fuels such as wood and therefore can cause various adverse health effects, since different epidemiological studies have shown that exposure to PAHs can increase the risk of developing cardiovascular diseases, diabetes, inflammation in the respiratory tract and decreased pulmonary function and respiratory parameters (Perez-Padilla *et al.* 2010; Rodríguez-Aguilar *et al.* 2019). Two of them, which were present in a high percentage in the population studied, were 1- and 2-OH-NAP, which are metabolites of naphthalene, this compound is also found in exposure to solid fuels such as wood combustion. In 2000, the IARC and the US EPA re-classified this compound as having the capacity to produce cancer in humans (Preus *et al.* 2003). In this context, the NIOSH proposes an exposure limit of 10 ppm for no more than 8 hours because of the

effects that this compound generates problems in acute exposures such as headaches, loss of appetite and nausea. However, exposure to this compound has also been reported to cause corneal damage, optic neuritis and even kidney damage, while ingestion of large amounts of naphthalene can cause severe hemolytic anemia. While the target organs affected are the eyes, skin, blood, liver, kidneys and central nervous system. On the other hand, the lethal dose reported in humans is 50 mg/kg so the main protective measures are focused on protecting these tissues to avoid inhalation or ingestion of these compounds in some type of personal protective equipment in the working population (NIOSH 2011; NIOSH 2019) However, this happens in controlled and well-regulated occupational environments. In the context of the Toco community, or as in precarious jobs, the population does not have the necessary protective measures, so exposure to this compound is unavoidable in these environments, which can cause adverse health effects. In addition, the actual exposure is not known because indoor air quality monitoring has not been carried out. Experimental studies in animal models have reported that exposure to this compound increases the incidence of cancer-related mainly to the respiratory tract. For this reason, the IARC has classified this compound as possibly carcinogenic to humans (Group 2B) (Yost *et al.* 2021). It is necessary to implement reference levels, as well as to better understand the consequences of chronic exposure to naphthalenes, and thus better estimate the actual exposure risk to which this population is exposed to provide a more complete picture of the health status of indigenous peoples and their quality of life. In a study conducted by Riojas-Rodríguez *et al.* (2011) where the authors also found that in the 10 hydroxylated metabolites that were evaluated in this study, such concentrations decreased when implementing the use of *Patsari stoves*, which by design, decrease the exposure of these pollutants, so the implementation of strategies such as these, can reduce exposure to PAHs and other pollutants in the air, contributing to the improvement of health and quality of life of these populations. Respect the IS, toxin this accumulates throughout the progression of CKD, it may indicate disease progression. Unfortunately, there are still no reference values for this biomarker, so the results of this work are compared with other studies in clinical settings. A study by Wang *et al.* (2019) where IS levels were evaluated in different groups to investigate their relationship with mortality in the

first 90 days of an acute kidney infection, revealed that biomarker levels were higher in patients with CKD ( $3070 \pm 301 \mu\text{g/L}$ ) than those with hospital-acquired infections ( $2704 \pm 750 \mu\text{g/L}$ ); however, these levels in persons with infections were also higher than in healthy persons ( $1730 \pm 110 \mu\text{g/L}$ ), which can be interpreted that, at higher IS concentrations, renal damage could be greater. In this study, the mean IS in the population was found to be  $193.4 \pm 91.85 \mu\text{g/L}$  which does not exceed the values of healthy subjects reported in these studies. In another study conducted by Cheng-Jui *et al.* (2011) where they measured the levels of Indoxyl Sulfate and cresyl sulfate in patients with different stages of CKD, the authors found that these two uremic toxins increased gradually as renal function declined; among the IS values reported were, Stage 3:  $3200 \pm 3000 \mu\text{g/L}$ ; Stage 4:  $5400 \pm 3600 \mu\text{g/L}$ ; Stage 5:  $19,900 \pm 10,500 \mu\text{g/L}$ ; Stage 5 with patients on hemodialysis:  $42500 \pm 15600 \mu\text{g/L}$ . As can be observed, toxin values increased as the disease progressed, as did cresyl sulfate. This is of concern as the accumulation of various uremic toxins can lead to adverse effects such as mortality from cardiovascular causes and infection events. Since the concentrations in this study are much lower than those compared in the two studies, it could be mentioned that the renal damage in this population is not yet as great as in those studies compared, however, since there are no reference values, it is not possible to indicate with certainty that the study population do not present or will present some type of renal damage in the future. No correlation was found between IS levels and PAH exposure, however, it does not imply that kidney damage is absent or that the compounds are not related to it. The presence of this uremic toxin means that there is renal damage, which worsens as time goes by because its elimination decreases, causing an increase in the risk of suffering some cardiovascular disease, which ends up worsening the state of health of people and increasing the probability of mortality more than 50% of deaths in those patients treated with hemodialysis are due to cardiovascular diseases, while the prevalence of cardiovascular complications is approximately 80% in patients on hemodialysis. As it can be seen, there is a close relationship between these two systems, which could be due to the accumulation of toxins in the body such as IS that cause some complications in the cardiovascular system (Gao and Liu 2017). It has been reported that exposure to these pollutants may be related to renal damage, an example is a study conducted by Flores-Ramirez *et al.*

(2021b) also in Toco, which revealed a correlation between the hydroxylated metabolites 1-OH-NAP, 2-OH-NAP, 9-OH-NAP, 9-OH-FLU and 4-OH-PHE with 4 biomarkers of early kidney damage that were evaluated in the study, which provides an overview of the damage that the inhabitants of the Toco area may be suffering. It is important to mention that it is not enough to evaluate only one PAH at the site, because as mentioned above, there is exposure to different compounds, so it is necessary to perform a broader and more varied analysis that consider a wider range of pollutants. Regarding respiratory health, of the men in the study, 3 obtained non-assessable spirometry. Of the women, 6 presented non-assessable spirometry and 5 presented normal respiratory patterns, which means that they did not present any type of respiratory difficulty at the time of the study, 2 with low restrictions; 2 with middle restrictions and 0 with severe restriction, and 1 below of the limit. On the other hand, it does not mean that at some point in the future they will develop some type of respiratory difficulty due to exposure to wood smoke. Four female participants presented mild or moderate restrictive patterns, this can be caused by several situations, an important one could be the continuous exposure to PAHs present in wood smoke at the time of cooking and in the future the continuous exposure to these pollutants can aggravate the scenario, causing severe restrictions or even developing respiratory diseases. An important fact to mention is that 100% of this population cooks their food and have a heating system that is based on the combustion of solids such as firewood.

Among the limitations reported for the analysis of the study data, due to the nature of the pilot study (reduced n), it was not possible to establish a correlation between biomarkers of exposure to PAHs, spirometry results and the presence of IS, it is recognized that a greater number of participants is needed to establish direct causality. Nevertheless, this study corroborates the application of various biomarkers for the accurate assessment of PAH exposure and biomarkers of effect such as IS, which can describe renal damage, as well as respiratory assessment.

The scenario of the population of Toco is difficult, on one hand, people are exposed to different types of threats ranging from physical pollutants from biomass smoke such as PM 10 and 2.5, and soot, which, along with these, come to some chemical pollutants such as PAHs and other air pollutants present in indoor air, some pesticides from the use of these in agriculture, as well as some

mycotoxins. These have different sources such as food contaminated by these mycotoxigenic fungi, without taking into account other possible pathogenic agents that can be harbored in food, air, water and soil, which end up causing chronic exposure through the three existing routes of exposure such as inhalation of particles and atmospheric pollutants, consumption of contaminated food, water that is often unhealthy and could be contaminated by microorganisms capable of causing diarrheal infections, inhalation and ingestion of dust particles that can bring with them different threats. Indigenous communities face various problems, from scarcity of resources to polluted environments, which undermine the development of these peoples, forcing them to migrate in search of better opportunities, language barriers, as well as poor access to the internet and education. Although there are health centers that have free diagnostic services, these are mainly located in urban centers, far from remote communities such as Tocoy, which means that people must pay for transportation, food and lodging expenses that many cannot afford, causing people to consciously or unconsciously ignore the risks to which they are exposed, normalizing situations that are affecting their health and quality of life.

## 5. Conclusion

The results of this study have shown that exists a chronic exposure to PAHs, among other pollutants present in the air due to traditional methods of cooking. Since the population of Tocoy is constantly exposed to indoor air pollution, it is necessary to monitor air quality to know the exact concentration to which these residents are exposed. Regarding IS levels, there are no reference values for this biomarker in this type of population, more studies are needed to establish cut off points and use it as a more practical, accessible and accurate method for the evaluation of renal damage and its progression. Besides, for the evaluation of respiratory function, further studies are needed, since the toxic potential of biofuel smoke is known to cause exposure to different pollutants such as PAHs and PM 10 and 2.5, which are known to affect mainly the respiratory tract. It is necessary to address these issues since the life quality of the population is being affected, which could cause probable illnesses in the future, or aggravate some that are already present in the population. There is a risk that people's health could be affected due to constant exposure. The community of Tocoy is abandoned, far from cities that have health centers, and the socio-economic

situation of the inhabitants is not the best either, as they are highly marginalized and have precarious socioeconomic conditions, in addition to the accumulated risks caused by mixtures of contaminants such as metals, aflatoxins, pesticides, pesticides and other pollutants, aflatoxins, pesticides or persistent organic compounds, pandemics such as COVID-19 and the prevalence of different non-communicable diseases that tend to affect the health of the ecosystem and the inhabitants (Díaz de León-Martínez *et al.* 2021 a). Therefore, it is necessary to propose new monitoring strategies that help in the early detection of diseases, as well as environmental health diagnostics and studies aimed at environmental problems such as air monitoring, water quality studies, among others. The present work serves as a pilot study to support the next studies to be carried out in this community or in communities that have similar conditions to those of Tocoy, which use traditional cooking and heating methods. The present study has background information on the evaluation of respiratory and renal health as well as exposure to different PAHs and provides a general overview of the situation faced by the community that may be affecting its development. This will allow us to know broadly what the challenges are, and subsequently propose comprehensive interventions that will benefit the environment and also the health of people, as well as propose programs and policies in these areas that contribute to access to a healthy environment and decent health, thus ensuring access to these human rights and contributing to achieving sustainable development goals, thus improving the quality of life of the community with a sustainable approach and a healthy environment.

## Acknowledgements

COPOCYT. Fideicomiso 23871 Multas Electorales Convocatoria 2021-01, Desarrollo y evaluación de un Sistema de tamizaje basado en la metabolómica exhalatoria para la clasificación y predicción de COVID largo mediante métodos de aprendizaje automatizado. Addressing the cumulative risk from emerging biological, chemical and social threats that will exacerbate the second outbreak of COVID-19 of CEEPAC/UASLP 2020.

## References

[ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2016. *ToxFAQs™- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. ¿What are the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. [Internet]; [cited on february 2022]. Available on: [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts69.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.html)

Alamo-Hernández U, Espinosa-García A, Rangel-Flores H, Farías P, Hernández-Bonilla D, Cortez, Díaz-Barriga F, Flores N, Rodríguez-Dozal S, Riojas-Rodríguez H. 2019. Environmental Health Promotion of a Contaminated Site in Mexico. *EcoHealth*. 16:317–329. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01407-5>

Alegbeleye O, Oluwatoyin B, Jackson V. 2017. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. *Environmental Management*. 60:758–783. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>

Barreto F, Barreto D, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukron G, Vanholder R, Massy Z. 2009. Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 4:1551–1558. <https://doi.org/10.2215/CJN.03980609>

Berumen-Rodríguez A, Díaz de León-Martínez L, Zamora-Mendoza B, Orta-Arellanos H, Saldaña Villanueva K, Barrera-López V, Gómez-Gómez A, Pérez-Vázquez F, Díaz-Barriga F, Flores-Ramírez R. 2021. Evaluation of Respiratory Function and Biomarkers of Exposure to Mixture of Pollutants in Brick-Kilns Workers from a Marginalized Urban Area in Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*. 28:23087–23098. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12413-y>

Cao L, Wang D, Wen Y, He H, Chen A, Hu D, Tan A, Shi T, Zhu K, Ma J, Zhou Y, Chen W. 2019. Effects of environmental and lifestyle exposures on urinary levels of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites: A cross-sectional study of urban adults in China. *Chemosphere*. 240:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124898>

Chen H, Ma S, Yu Y, Liu R, Li G, Huang H, An T. 2019. Seasonal profiles of atmospheric PAHs in an e-waste dismantling area and their associated health risk considering bioaccessible PAHs in the human lung. *Science of the Total Environment*. 683: 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.385>

Cheng-Jui L, Han-Hsiang C, Chi-Feng P, Chih-Kuang C, Tue-Jen W, Fang-Ju S, Chih-Jen W. 2011. p-Cresylsulfate and Indoxyl Sulfate Level at Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 25: 191–197. <https://doi.org/10.1002/jcla.20456>

Ciao L, Zhou Y, Tan A, Shi T, Zhu C, Xiao L, Zhang Z, Yang S, Mu G, Wang X, *et al.* 2020. Oxidative damage mediates the association between polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and lung function. *Environmental Health*. 19:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00621-x>

Cincinelli A, Matellini T. 2017. Indoor Air Quality and Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14:1-5. <https://doi.org/10.3390/ijerph14111286>

Coates A, Graham B, McFadden R, McParland C, Dilshad M, Provencher S, Road J. 2013. Spirometry in primary care. *Canadian Respiratory Journal*. 20(1):13–21. <https://doi.org/10.1155/2013/615281>

[UNFCCC] United Nations Framework Convention on Climate Change. 2018. Primera conferencia mundial sobre contaminación del aire y salud. News UN Climate; [cited on february 16 of 2022] Available on: <https://unfccc.int/es/news/primer-conferencia-mundial-sobre-contaminacion-del-aire-y-salud>

Díaz de León-Martínez L, Flores-Ramírez R, Rodríguez-Aguilar M, Berumen-Rodríguez A, Pérez-Vázquez F, Díaz-Barriga F. 2021a. Analysis of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in precarious workers of highly exposed occupational scenarios in Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*. 28:23087–23098. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12413-y>

Díaz de León-Martínez L, Ortega-Romero M, Barbier O, Pérez-Herrera N, May-Euan F, Perera-Ríos J, Rodríguez-Aguilar M, Flores-Ramírez R. 2021b. Evaluation of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers of early kidney damage in indigenous children from Ticul, Yucatán, México. *Environmental Science and Pollution Research*. 28:52001–52013. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14460-x>

Díaz de León-Martínez L, Ortega-Romero M, Grimaldo-Galeana M, Barbier O, Vargas-Berrones K, García-Arreola E, Rodríguez-Aguilar M, Flores-Ramírez R. 2020a. Assessment of kidney health and exposure to mixture pollutants in the Mexican indigenous population. *Environmental Science and Pollution Research*. 27:34557–34566. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09619-x>

Díaz de León-Martínez L, Sierra-de la Vega L, Palacios-Ramírez A, Rodríguez-Aguilar M, Flores-



Ramirez R. 2020b. Critical review of social, environmental and health risk factors in the Mexican indigenous population and their capacity to respond to the COVID-19. *Science of the Total Environment*. 733. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139357>

Drwal E, Rak A, Grgoraszczyk R. 2018. Review: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) - action on placental function and health risks in future life of newborns. *Toxicology*. 411:133-142. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.003>

Ferhat M, Esen F, Tasdemir Y. 2020. Biomonitoring and Source Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Using Pine Tree Components from Three Different Sites in Bursa, Turkey. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 78:646–657. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00722-1>

Fiordelisi A, Piscitelli P, Trimarco B, Coscioni E, Iaccarino G, Sorriento D. 2017. The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev*. 22(3):337-347. <https://doi.org/DOI.10.1007/s10741-017-9606-7>

Flores-Ramirez R, Berumen-Rodríguez A, Martínez-Castillo A, Alcántara-Quintana E, Díaz-Barriga F, Díaz de León-Martínez L. 2021a. A review of Environmental risks and vulnerability factors of indigenous populations from Latin America and the Caribbean in the face of the COVID-19. *Global Public Health*. 16(7):975–999. <https://doi.org/10.1080/17441692.2021.1923777>

Flores-Ramirez R, Ortega-Romero M, Christophe-Barbier O, Mélen-dez-Marmolejo J, Rodríguez-Aguilar M, Lee-Rangel H, Díaz de León-Martínez L, 2021b. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures and early kidney damage in Mexican indigenous population. *Environmental Science and Pollution Research*. 28:23060–23072. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12388-w>

Gao H, Liu S. 2017. Roles of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. *Life Sciences*. 185:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.07.027>

García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, del Campo F, Galdiz J, Giner, J, González-Mangado N, Ortega F, Puente L. 2013. Espirometría. *Archivos de Bronconeumología*. 49(9):388–401. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.04.001>

[GLOBAL] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2019. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. report.

[IHME] Institute for Health Metrics and Evaluation. 2019. Global Burden Disease Compare. Global. Both Sexes, All Ages, 2019, Deaths; [updated on December 2019]; cited on february 2021. Available on: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>

[IARC] International Agency for Research on Cancer. 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures.

Jongeneelen F. 2001. Benchmark Guideline for Urinary 1-Hydroxypyrene as Biomarker of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Ann. Occupational Hygiene*. 45 (1):3–13.

Kim K.-H, Jahan A, Kabir E, Brown C. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*. 60:71–80. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>

Leong S, Sirich T. 2016. Review: Indoxyl Sulfate—Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. *Toxins*. 8:1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins8120358>  
[NIOSH] National Institute for Occupational Safety And Health. 2011. Naphthalene. [updated on 2011; cited on february 2021. Available on: <https://www.cdc.gov/niosh/pel88/91-20.html>

[NIOSH] National Institute for Occupational Safety And Health. 2019 Naphthalene:cited on february 2021. Available on: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0439.html>

[PAHO] Panamerican Health Organization, [WHO] World Health Organization.[update on 2016]. Calidad del aire. Datos Clave. [Cited on february 2021]. Available on: [https://www.paho.org/es/temas/calidad-aire#:~:text=La exposición a altos niveles,vulnerable%2C niños%2C adultos mayores y](https://www.paho.org/es/temas/calidad-aire#:~:text=La%20exposici%C3%B3n%20a%20altos%20niveles,vulnerable%20ni%C3%B1os%20adultos%20mayores%20y)

Pérez-Maldonado IN, Ochoa-Martínez AC, López-Ramírez ML, Varela-Silva JA. 2018. Urinary levels of 1 hydroxypyrene and health risk assessment in children living in Mexican communities with a high risk of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *International Journal of Environmental Health Research*. 29(3):348-357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1549727>

Perez-Padilla P, Schilman A, Riojas-Rodríguez H. 2010. Respiratory health effects of indoor air pollution. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 14(9):1079–1086.

Preus R, Angerer J, Drexler H. 2003. Naphthalene-an environmental and occupational toxicant. *International Archives of Occupational and Environmental Health* Volume. 76:556–576. <https://doi.org/10.1007/s00420-003-0458-1>

Pruneda-Álvarez L, Pérez-Vázquez F, Salgado-Bustamante M, Martínez-Salinas R, Martínez-Pelallo N, Pérez-Maldonado N. 2012. Exposure to indoor air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons, toluene, benzene) in Mexican indigenous women. *Indoor Air*. 22:140–147. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2011.00750.x>

Prüss-Üstün A, Wolf J, Corvalán C, Neville T, Bos R, Neira M. 2016. Diseases due to unhealthy environments: an updated estimate of the global burden of disease attributable to environmental determinants of health. *Journal of Public Health*. 39:464–475. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw085>

Riojas-Rodríguez H, Schilman A, Marron-Mares A, Masera O, Li Z, Romanoff L, Sjödin A, Rojas-Bracho A, Needham L, Romieu I. 2011. Impact of the Improved Patsari Biomass Stove on Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biomarkers and Carbon Monoxide Exposures in Rural Mexican Women. *Environmental Health Perspectives*. 119:1301–1307. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002927>

Rodríguez-Aguilar M, Díaz de León-Martínez L, García-Luna S, Gómez-Gómez, A, González-Palomo A, Pérez-Vázquez F, Díaz-Barriga F, Trujillo J, Flores-Ramírez R. 2019. Respiratory health assessment and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Mexican indigenous population. *Environmental Research and Pollution Research*. 26:25825–25833. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05687-w>

Rodríguez-Aguilar M, Díaz de León-Martínez L, Gorocica-Rosete P, Pérez Padilla R, Thirión-Romero I, Ornelas-Rebolledo O, Flores-Ramírez R. 2020. Identification of breath-prints for the COPD detection associated with smoking and household air pollution by electronic nose. *Respiratory Medicine*. 163:105901. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105901>

Sarigiannis D, Karakitsios S, Zikopoulos D, Nikolaki S, Kermeidou M. 2015. Lung cancer risk from PAHs emitted from biomass combustion. *Environmental Research*. 137:147–156. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.009>

Singh A, Kamal R, Tiwari R, Kumar Gaur V, Bihari V, Satyanarayana V, Patel D, Azeez P, Srivastava V, Ansari A, *et al.* 2018. Association between PAHs biomarkers and kidney injury biomarkers among kitchen workers with microalbuminuria: A cross-sectional pilot study. *Clinica Chimica Acta*. 487:349–356. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.021>

Suleyman G, Alangaden G, Bardossy A. 2018. The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. *Current Infectious Disease Report*. 20:1–11. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0620-2>

Szu-Chun H, Ko-Lin K, Chih-Cheng W, Der-Cheng T. 2017. Indoxyl Sulfate: A Novel Cardiovascular Risk Factor in Chronic Disease. *Journal of the American Heart Association*. 1–8. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005022>.

Tan X, Cao X, Zou J, Shen B, Zhang X, Liu Z, Lv W, Teng J, Ding X. 2017. Indoxyl sulfate, a valuable biomarker in chronic disease and dialysis. *Hemodialysis International*. 21(2):161–167. <https://doi.org/10.1111/hdi.12483>

Tavera I, Tames F, Silva J, Ramos S, Homem V, Ratola N, Carreras H. 2018. Biomonitoring levels and trends of PAHs and synthetic musks associated with land use in urban environments. *Science of the Total Environment*. 618:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.295>

Villaseñor C, Martínez y Martínez R. 2013. Enfermedad Renal Crónica. In C. Alonso Rivera & A. Rentería Cárde. 7th ed. *Salud y Enfermedad del Niño y del Adolescente*. México. El Manual Moderno. p. 1069–1072.

Wang W, Hao G, Pan Y, Ma S, Yang T, Shi P, Zhu Q, Xie Y, Ma S, Zhang Q, *et al.* 2019. Serum indoxyl sulfate is associated with mortality in hospital-acquired acute kidney injury: a prospective cohort study. *BMC Nephrology*. 20 (57):1471–2369. <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1238-9>

[WHO] World Health Organization. 2018. Nueve de cada diez personas de todo el mundo respiran

aire contaminado; [cited on february 2021]. Available on: <https://www.who.int/es/news/item/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action>

[WHO] World Health Organization, Prüss-Üstün A, Corvalán C, 2006. Ambientes Saludables y Prevención de enfermedades. [Internet]; [cited on february 2021]. Available on : [https://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/previdis-execsumsp.pdf](https://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/previdis-execsumsp.pdf)

Xiong S, Leong K. 2019. Rapid and robust HPLC Analysis of Indoxyl Sulfate Using Quasar C18 Column.

Yost E, Galizia A, Kapraun D, Persad A, Vulmiri S, Angrish M, Lee J, Druwe I. 2021. Health Effects of Naphthalene Exposure: A systematic Eviden Map and Analysis of Potential Considerations for Dose-Response Evaluation. *Environmental Health Perspectives*. 129(7):076002.1-076002.30. <https://doi.org/10.1289/EHP7381>.

Zhu Y, Tao S, Sun J, Wang X, Li X, Tsang D, Zhu L, Shen G, Huang H, Cai C, *et al.* 2019. Multimedia modeling of the PAH concentration and distribution in the Yangtze River Delta and human health risk assessment. *Science of the Total Environment*. 647:962–972. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.075>

## Validação da espécie *Dendrocephalus brasiliensis* como organismo teste de água doce em estudos ecotoxicológicos para avaliação de fármacos utilizados no tratamento da COVID-19

### Validation of the species *Dendrocephalus brasiliensis* as a freshwater test organism in ecotoxicological studies for evaluation of pharmaceuticals used in the treatment of COVID-19

de Andrade Barbosa, Andreza Miranda<sup>1\*</sup>; da Silva, José Custódio<sup>2</sup>; dos Santos Mendonça Oliveira, Jaísa Marília<sup>2</sup>; Alejandro Navoni, Julio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente – PRODEMA, Curso de Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Associação Plena em Rede. Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Sen. Salgado Filho 3000 - Lagoa Nova, CEP 59078-900, Contato: 55 84 32119209, Natal, estado Rio Grande do Norte, Brasil.

<sup>2</sup>Diretoria Acadêmica de Recursos Naturais (DIAREN), Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN), Av. Sen. Salgado Filho, 1559 – Tirol, CEP 59015-000, Contato: 55 84 4005-9949, Natal, estado Rio Grande do Norte, Brasil.

\*mab.andreza@hotmail.com

Recibido 24/01/2022

Aceptado 22/06/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Resumo.** Os contaminantes emergentes (CE), são substâncias químicas (fármacos, produtos de higiene pessoal, drogas ilícitas entre outros) que estão presentes no ambiente como consequência da atividade antrópica e a falta de adequação dos processos convencionais de tratamento de água e esgoto que não logram removê-los eficientemente. Na atualidade o uso disseminado e desmedido de fármacos no tratamento da pandemia de COVID 19 tem aumentado a preocupação dos impactos decorrentes da contaminação por fármacos em ambientes aquáticos, consequência da liberação no ambiente de grandes quantidades destes compostos. Assim, estudos de ecotoxicidade aquática são fundamentais para avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas nas análises de impactos ambientais, sobretudo quando utilizado organismos representativos da biota aquática local, garantindo assim, maior confiabilidade e representatividade dos resultados obtidos. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi validar a utilidade do *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta) espécie autóctone do nordeste brasileiro como organismo teste para estudos de ecotoxicidade de fármacos utilizados no tratamento da COVID 19. Testes ecotoxicológicos utilizando *D. brasiliensis* foram realizados utilizando soluções dos fármacos paracetamol, hidroxicloroquina, ivermectina e ibuprofeno, em concentrações de 0,0025 até 600,0 mg/L seguindo os protocolos descritos pela Associação Brasileira para Normas Técnicas (ABNT) para toxicidade aguda, protocolo padronizado para a realização do ensaio ecotoxicológicos utilizando como organismo teste a *Daphnia magna*, o qual foi empregada como referência para comparar o padrão de resposta. Com os resultados obtidos foi realizado o cálculo da  $CL_{50-48h}$  considerando como desfecho a morte dos organismos, ivermectina (< 0,0025 - < 0,0025), hidroxicloroquina (3,70 - 14,09), ibuprofeno (12,25 - 107,52), paracetamol (8,53 - 9,61), resultados  $CL_{50-48h}$  mg/l *D. magna* e *D. brasiliensis* respectivamente. Os resultados obtidos mostraram um padrão diferenciado dependente da espécie e do fármaco analisado observando-se uma menor sensibilidade frente a exposição da *D. brasiliensis* em comparação a *D. magna* demonstrando a valia da *D. brasiliensis* como organismo teste. Pesquisas futuras dirigidas a analisar as potenciais interações destes fármacos em concentrações ambientais reais são necessárias para completar a validação e ter uma aproximação dos eventos acometidos em ambientes impactados por estes fármacos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia; Farmacocontaminação; *Branchoneta*; Pandemia sars-COV 19.

**Abstract.** Emerging contaminants (EC) are chemical substances (pharmaceuticals, personal hygiene products, illicit drugs, among others) that are present in the environment because of human activity and the lack of adequacy of conventional water and sewage treatment processes that do not manage to remove them efficiently. Currently, the widespread and excessive use of drugs in the treatment of the COVID 19 pandemic has increased concern about the impacts resulting from contamination by drugs in aquatic environments, because of the release into the environment of large amounts of these compounds. Thus, aquatic ecotoxicity studies are essential to evaluate the effect of toxic chemical substances in the analysis of environmental impacts, especially when using representative organisms of the local aquatic biota, thus ensuring greater reliability and representativeness of the results obtained. In view of this, the objective of this work was to validate the usefulness of *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta), an autochthonous species from northeastern Brazil as a test organism for ecotoxicity studies of drugs used in the treatment of COVID 19. Ecotoxicological tests using *D. brasiliensis* were performed using drug solutions paracetamol, hydroxychloroquine, ivermectin and ibuprofen, in concentrations from 0.0025 to 600.0 mg/L following the protocols described by the Brazilian Association for Technical

Norms (ABNT) for acute toxicity, standardized protocol for carrying out the ecotoxicological assay using as a test organism *Daphnia magna*, which was used as a reference to compare the response pattern. Based on the results obtained, the  $LC_{50-48h}$  was calculated considering the death of organisms, ivermectin ( $< 0.0025 - < 0.0025$ ), hydroxychloroquine (3.70 - 14.09), ibuprofen (12.25 - 107.52), paracetamol (8.53 - 9.61), results  $LC_{50-48h}$  mg/l *D. magna* and *D. brasiliensis* respectively. The results obtained showed a differentiated pattern depending on the species and the analyzed drug, observing a lower sensitivity to exposure of *D. brasiliensis* compared to *D. magna*, demonstrating the value of *D. brasiliensis* as a test organism. Future research aimed at analyzing the potential interactions of these drugs at real environmental concentrations is necessary to complete the validation and to have an approximation of the events affected in environments impacted by these drugs.

**Keywords:** Ecotoxicology; Pharmacocontamination; Branchoneta; Sars-COV pandemic 19.

## Introdução

Substâncias químicas empregadas na indústria, agricultura e medicina (ou seus metabolitos) podem, durante o processo de fabricação, uso, ou descarte, resultar na eliminação de rejeitos para o meio ambiente, com potenciais consequências tóxicas para a biota e os seres humanos. Essas substâncias ocorrem em descargas de diferentes tipos, incluindo esgoto, escoamento de águas pluviais, descargas industriais e descargas rurais (Omotola *et al.* 2022).

Atualmente o termo contaminante emergente tem se destacado, graças a seu potencial tóxico e capacidade de estar presente no solo, água e ar. Apesar do risco que apresentam ao ecossistema, a maior parte desses contaminantes não são regulados pela legislação (Montagner *et al.* 2017). Os fármacos são especificamente criados para serem substâncias biologicamente ativas, em seu princípio esses medicamentos buscam serem eficazes em baixas concentrações. O alto consumo desses compostos nos últimos anos foram seguidos pela introdução contínua dessas moléculas biologicamente ativas nos ambientes naturais. Sua atividade biológica tem potencial de interferir nos processos bioquímicos e fisiológicos, podendo causar efeitos adversos e prejudicar a saúde. A capacidade dos ingredientes farmacêuticos de serem absorvidos e de interagir com organismos vivos os torna um perigo potencial para toda biota. Atualmente os produtos farmacêuticos já são reconhecidos como uma ameaça aos ecossistemas aquáticos (Sangion e Gramatica 2016; Mezzelani *et al.* 2018).

Com a chegada da pandemia de Covid-19, novos desafios surgiram. Dentre eles uma incessante busca por um tratamento, e fármacos não comprovados cientificamente para tratamento de Covid-19 foram rapidamente adotados como potencial tratamento para esta doença. Essa sistemática acarretou no excesso de automedicação e de tratamento secundário, com graves

riscos à saúde humana e ampliando os riscos sanitários e os danos ambientais relacionados ao descarte/lançamento desses fármacos no ambiente (Falavigna *et al.* 2020).

Como consequência, fármacos massivamente utilizados em distintos países, incluindo o Brasil, tais como Hidroxicloroquina, Ivermectina, Paracetamol e Ibuprofeno, que estão presentes em efluentes de ETE são lançados em corpos hídricos sem o uso de tecnologias de remoção adequadas (Feng *et al.* 2013).

Para compreender os impactos ambientais destas substâncias, os ensaios ecotoxicológicos tem grande relevância, pois buscam garantir a representatividade das consequências que estas substâncias podem acarretar nos corpos hídricos e contribuem para estabelecer níveis guia para a proteção da biota aquática (Quadra *et al.* 2016; Lopes *et al.* 2018).

Os testes de ecotoxicidade são instrumentos importantes para ponderar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes. Esses testes consistem em ensaios laboratoriais, realizados sob perspectivas experimentais específicas e controladas, visando estabelecer a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos), por meio da exposição de organismos-testes a diferentes concentrações de amostra, os efeitos tóxicos produzidos sobre esses organismos são observados e quantificados (Omotola *et al.* 2022; Jacob *et al.* 2021).

O uso de testes ecotoxicológicos para análise da qualidade de águas e efluentes já é regulamentado oficialmente no Brasil, através da Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 2005). Essa resolução aponta que toxicidade é qualquer efeito desconforme ocasionado a organismos testes, podendo ser alterações genéticas, imobilidade, e até letalidade.

Sendo assim, estudos de ecotoxicidade que ava-

liem o potencial de bioacumulação de fármacos e suas concentrações no ambiente, por meio da avaliação do seu destino e quantidade em que são lançados é fundamental para conhecer os riscos associados à exposição de novos compostos que ainda não estão contemplados nas legislações vigentes, permitindo antecipar e mitigar os danos para as gerações futuras (Montagner *et al.* 2017).

Nesse contexto, a *D. magna* é considerada um dos principais organismos de ensaios ecotoxicológicos padrão. Entretanto, é importante considerar a utilização de espécies autóctones, como a *D. brasiliensis*, em pesquisas realizadas em regiões tropicais, pois é uma espécie adaptada às especificidades do ecossistema local e fornecem resultados realísticos (Santos *et al.* 2018).

A *D. brasiliensis*, conhecida popularmente como branchoneta, é um micro crustáceo de água doce da família *Thamnocephalidae*, tipicamente encontrado em lagoas temporárias no bioma Caatinga e em área costeira (Santos *et al.* 2019). Esse organismo vive em poças temporárias, onde os ovos são colocados em repouso no fundo da poça. Esses ovos possibilitam a sobrevivência da espécie na estação de seca, e são responsáveis pela disseminação da mesma. Esse micro crustáceo já foi encontrado em piscinas naturais e artificiais da Caatinga do norte de Minas Gerais, ao norte do Rio Grande do Norte e também em piscinas no Gran Chaco, no centro-norte da Argentina (Barros-Alves *et al.* 2016).

Sendo assim, devido as recentes preocupações com a presença de produtos farmacêuticos no meio ambiente em particular decorrente do consumo e utilização massiva de fármacos empregados no tratamento da COVID 19, o objetivo deste trabalho foi validar o organismo *D. brasiliensis* como organismo teste para estudos de ecotoxicidade e comparar os resultados com a espécie *D. magna* como organismo teste de referência frente a exposição aos compostos Hidroxicloroquina, Ivermectina, Paracetamol e Ibuprofeno.

## Materiais e Métodos

### Métodos de ensaio

Os testes de ecotoxicidade foram realizados utilizando quatro formulações farmacológicas de medicações utilizadas corriqueiramente no tratamento da COVID-19. Soluções aquosas destes fármacos foram preparadas por diluição em água destilada ultra pura com auxílio de agitador magnético a partir das suas concentrações comerciais: hidroxicloroquina (400mg – EMS S/A, São Paulo, Brasil), ivermectina (6 mg – VITAME-

DIC, Goiás, Brasil), paracetamol (200mg/L – Airela, Santa Catarina, Brasil) e ibuprofeno (600mg - Prati-donaduzzi, Paraná, Brasil). Informação adicional sobre a formulação dos fármacos utilizados nesta pesquisa estão disponíveis em <https://consultaremedios.com.br/>.

Posteriormente a partir da solução padrão foram realizadas as outras diluições com água do cultivo com mesmos padrões dos testes, para obter as concentrações de testagem utilizadas no experimento: Hidroxicloroquina (0,00 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L, 100,0 mg/L e 400,0 mg/L), ivermectina (0,00 mg/L, 0,0025 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L e 1,0 mg/L), paracetamol (0,00 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L) e ibuprofeno (0,00 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L, 60,0 mg/L, 100,0 mg/L, 200,0 mg/L, 300,0 mg/L e 600,0 mg/L). Para o controle de qualidade do processo, soluções de Cloreto de potássio (KCl) (marca NEON), foram utilizadas nas concentrações (0,0 mg/L, 10,0 mg/L, 30,0 mg/L, 50,0 mg/L, 90,0 mg/L, 110,0 mg/L, 130,0 mg/L, 160,0 mg/L, 190,0 mg/L e 210,0 mg/L).

### Organismos e manutenção do cultivo

O cultivo dos organismos-testes foi realizado no laboratório de ecotoxicologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), com a *Daphnia magna* de acordo com a metodologia determinada pela ABNT (2017) e com a *Dendrocephalus brasiliensis* baseado no método utilizado por Veiga e Vital (2002).

Os cistos de *D. brasiliensis* foram adquiridos da empresa *Fishfood*, localizada em São Paulo - SP. A produção foi realizada no IFRN, campus Natal Central, localizado na cidade de Natal - RN, de acordo com a metodologia apresentado por Santos *et al.* (2019). Inicialmente, 5 g de cistos incubáveis foram mantidos na proporção de 1 g/L de água em garrafas PET de 2 L. Após 24 h, os náuplios nascidos foram aclimatados em tanques de água parada com aeração até atingirem a formação de ovisac. A alimentação da *D. brasiliensis* consistiu em fitoplâncton. As microalgas foram cultivadas em condições de laboratório em fotobiorreatores com ar borbulhando continuamente para criar um fluxo. As trocas de água e a limpeza dos tanques foram realizadas semanalmente. Os parâmetros da água foram monitorados constantemente e mantidos a  $28 \pm 1$  °C, pH  $8 \pm 0,5$ .

O Cultivo de *D. magna* foi mantido no Laboratório de Ecotoxicologia do IFRN. Uma grande popula-

ção de clones mistos de *D. magna* foi propagada com culturas iniciais adquiridas externamente. A população foi mantida em água doce com aeração, preparada e regulada com temperatura  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  e luz 8h:16h fotoperíodo claro/escuro. As culturas foram alimentadas diariamente com fitoplâncton. Todos os procedimentos para manutenção e condução do teste de toxicidade foram realizados seguindo adaptação da norma NBR 13373 da ABNT (2017). Os tanques de cultivo foram limpos semanalmente, e a água de manutenção do cultivo foi renovada duas vezes por semana (Maggio *et al.* 2021).

### Teste de ecotoxicidade

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar que envolveu levantamento dos resultados dos testes por 8 horas, sendo realizada a leitura a cada uma hora, posteriormente nas primeiras 12 horas e depois a cada 24 horas. Sendo decidido trabalhar com a leitura após 24 e 48 horas de acordo com o levantamento das informações, e visando a resposta observada em ambos os organismos utilizados nos testes.

Esse estudo preliminar também foi realizado para definir as concentrações a serem utilizadas nos testes para cada composto, seja ele fármaco, ou substância controle (KCl), ficando definido as concentrações apresentadas anteriormente nos materiais e métodos.

A bateria de testes de ecotoxicidade, foi realizada buscando a análise e validação da *D. brasiliensis*, avaliando quatro fármacos (Hidroxiclороquina, Ivermectina, Paracetamol e Ibuprofeno), e a solução padrão KCl como referência. Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando 10 indivíduos em um volume de 300 ml em cada réplica

nas diferentes concentrações, além do branco para o controle, e tiveram duração de 48 horas. O controle de qualidade foi mantido por meio do pH que ficou em média  $7,5 \pm 0,1$ ; dureza  $44 \pm 3$  mg/L CaCO<sub>3</sub>; temperatura de conforto de  $28^{\circ}\text{C}$ , suportando até  $34^{\circ}/36^{\circ}\text{C}$ .

Ao fim do período de exposição, foi realizada a contagem do número de organismos mortos a fim de se estabelecer a concentração letal média. O CL<sub>50-48h</sub> foi calculado usando o método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton *et al.* 1977), através do programa TOXSTAT 5.3. A validação dos resultados analisados foi realizado utilizando como substância de referência cloreto de potássio.

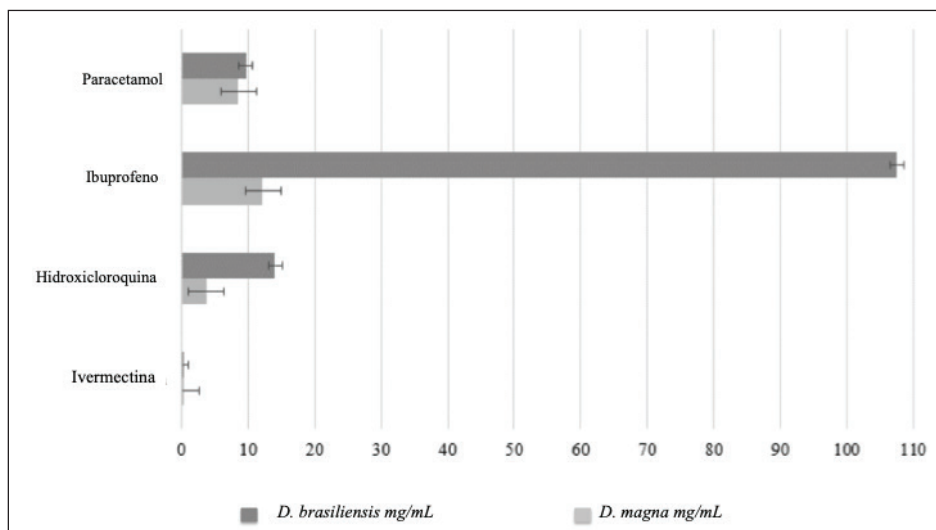
### Resultados e Discussão

Em relação aos fármacos testados a ivermectina, como já era esperado devido a sua característica antiparasitária, tanto para a *D. magna* como para a *D. brasiliensis* não possibilitou o cálculo do CL<sub>50-48h</sub>, uma vez que, os organismos tiveram mortalidade superior a 50% para a menor concentração utilizada, de 0,0025 mg/L. Em razão das suas características a ivermectina, mostra alta complexidade ambiental, pois dificulta a avaliação da mortalidade dos organismos testes, além de, ser um problema ecológico quando presente no ambiente, já que essa medicação é fabricada para eliminar vermes e parasitas, o que por consequência acarreta na mortalidade dos crustáceos aquáticos.

Para a hidroxiclороquina e ibuprofeno a *D. brasiliensis* se mostrou menos sensível do que a *D. magna*. No caso de Ivermectina e Paracetamol a resposta ecotoxicológica observada foi comparável (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1.** Descrição dos resultados obtidos mediante ensaios de toxicidade aguda dos fármacos Ivermectina, hidroxiclороquina, ibuprofeno e paracetamol além da resposta observada utilizando a substância padrão KCl utilizando *D. magna* e *D. brasiliensis*. Resultados expressados como CL<sub>50-48h</sub> com limite de confiança de 95%.

		<i>D. magna</i> mg/L	<i>D. brasiliensis</i> mg/L
Ivermectina	CL <sub>50-48h</sub>	< 0,0025	< 0,0025
Hidroxiclороquina	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	3,70 (3,22 - 4,25)	14,09 (12,20 - 16,28)
Ibuprofeno	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	12,25 (5,60 - 26,81)	107,52 (90,54 - 127,68)
Paracetamol	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	8,53 (3,96 - 18,41)	9,61 (6,78 - 13,62)
KCl	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	120,35 (74,86 - 177,40)	35,59 (17,79 - 71,10)



**Figura 1.** Gráfico comparativo do efeito ecotoxicológico observado mediante ensaios realizados utilizando *D. magna* e *D. brasiliensis*. Resultados expressados como CL<sub>50-48h</sub> e erro padrão expresso em porcentagem.

Em relação ao teste realizado com KCl, os valores obtidos foram semelhantes aos reportados na bibliografia. Por exemplo, num estudo realizado por Santos *et al.* (2018) utilizando *D. brasiliensis* foi reportado um valor de EC<sub>50-48h</sub> (95% LC) = 47,1 (25,3 – 70,7), ratificando a reprodutibilidade experimental dos resultados e validando a *D. brasiliensis* como organismo teste para estudos de ecotoxicidade. Além disso, os resultados obtidos com *D. magna*, também apresentou valores de resposta comparáveis com os reportados na bibliográfica. Por exemplo, considerando o mencionado autor, os valores reportados frente a exposição com KCl para *D. magna* foram: EC<sub>50-48h</sub> (95% LC) 100,9 (74,1–120,8), ratificando a validade experimental obtida nesta experiência. A critério de comparação não foi encontrado na literatura artigos que avaliassem o CL<sub>50-48h</sub> com a *D. brasiliensis* para nenhum dos fármacos aqui testados, sendo assim, este é um estudo pioneiro utilizando essa espécie para avaliação ecotoxicológica desses fármacos. Vale ressaltar que, além da

representatividade da região semiárida que essa espécie possui, comparativamente a utilização desta espécie é facilitada pelo baixo investimento requerido já que para cada grama de cisto são gerados na ordem de 380.000 náuplios, e por ser um organismo filtrador é facilmente alimentada por emulsão de algas, outrossim, devido as suas maiores proporções em relação a outros micros crustáceos, facilitando a realização e incorporação de testes de ecotoxicidade em atividades de monitoramento ambiental (Lopes *et al.* 2007; Santos *et al.* 2019).

Em relação a *D. magna* estudos que avaliassem o CL<sub>50-48h</sub> para hidroxicloroquina também não foi identificado. Pesquisas que avaliam CL<sub>50-48h</sub> com a *D. magna*, para os fármacos ibuprofeno, paracetamol e ivermectina, apontaram diferentes faixas de concentração, como pode ser visto na Tabela 2. Os valores reportados no presente estudo ficaram próximos dos apresentados por Feng *et al.* (2013), para o ibuprofeno e paracetamol e Garric *et al.* (2007) para ivermectina.

**Tabela 2.** Resultados ecotoxicológicos da exposição a fármacos (ibuprofeno, paracetamol e ivermectina) em testes ecotoxicológicos descritos na literatura utilizando *D. magna* - CL<sub>50-48h</sub>.

	Mínimo	Máximo	Autor
CL <sub>50-48h</sub> ibuprofeno	9,10 mg/L	175,0 mg/L	(Iannacone e Alvaríño 2009); (Feng <i>et al.</i> 2013)
CL <sub>50-48h</sub> paracetamol	9,20 mg/L	62,3 mg/L	(Iannacone e Alvaríño 2009); (Feng <i>et al.</i> 2013)
CL <sub>50-48h</sub> ivermectina	1,2x10 <sup>-6</sup> mg/L mg/L	1,7x10 <sup>-6</sup> mg/L	(Garric <i>et al.</i> 2007)



## Conclusão

Os resíduos de compostos emergentes, mais especificamente relacionados à comercialização e consumo de fármacos, vêm se tornando um problema de escala mundial nas últimas décadas. O incremento do consumo prescrito e a automedicação proporcionou um impacto consequente no quantitativo desses resíduos (princípios ativos) no meio ambiente. Diante disso, estudos que avaliem o impacto destas substâncias na biota aquática são de grande importância, principalmente quando utilizados espécies nativas representativas do cenário ambiental estudado. Baseado no que foi exposto ao longo deste artigo, foi verificado a utilidade como organismo teste para ensaios ecotoxicológicos da espécie nativa da região semiárida *D. brasiliensis*, em relação a sua sensibilidade aos fármacos hidroxicroloquina, ivermectina, paracetamol e ibuprofeno, com boa reprodutibilidade dos resultados (validade interna dos resultados), características essenciais para sua validação como organismos teste candidata para monitoramentos ambientais. Comparativamente com a *D. magna* a *D. brasiliensis* se mostrou menos sensível o que possibilita a sua implementação como espécie complementar para a representação mais abrangente dos potenciais impactos possíveis sobre a biota da área estudada. Estudos futuros direcionados a avaliar as possíveis interações dos fármacos testados em concentrações ambientais reais são necessárias para completar a validação e ter uma aproximação dos eventos acometidos em ambientes impactados por estes fármacos.

## Bibliografia

[ABNT] Associação Brasileira de Normas Técnicas 2017. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: Abnt, 20 p.

Barros-Alves SP, Alves DFR, Bolla Junior EA, Rabet N, Hirose GL. 2016. Morphological review of the freshwater fairy shrimp *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921 (Anostraca: thamocephalidae). Nauplius. 24(0):1-10. <http://dx.doi.org/10.1590/2358-2936e2016008>.

[CONAMA] Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução CONAMA nº 357 [Internet]. [Acesso em: 03 jan. 2022]. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005)

[classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfcd\\_a\\_ltrd\\_re\\_s\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_2011.pdf](http://classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_ltrd_re_s_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf)

Connell DW. 2014. Ecotoxicology. Reference Module In Biomedical Sciences. 3(0):1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.00213-0>.

Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova. 31(7):1820-1830.

Dana E. 2017. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: a review. Microporous and Mesoporous Materials. 247(0):145-157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.03.050>.

Falavigna M, Colpani V, Stein C, Azevedo LCP, Bagattini AM, Brito Gabriela V, Chatkin JM, Cimerman S, Corradi MFB, Cunha CA. 2020. Guidelines for the pharmacological treatment of COVID-19. The task force/consensus guideline of the Brazilian Association of Intensive Care Medicine, the Brazilian Society of Infectious Diseases and the Brazilian Society of Pulmonology and Tisiology. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. 32(2):1-31. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507x.20200039>.

Feng L, Van H, Eric D, Rodrigo MA, Esposito G, Oturan MA. 2013. Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. Chemical Engineering Journal. 228(0):944-964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.061>.

Garric J, Bernard V, Duis K, Pery A, Junker T, Ramil M, Fink G, Ternes TA. 2007. Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Chemosphere. 69(0):903-910.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. Environmental Science & Technology. 11(7):714-719.

Iannacone J, Alvariño L. 2009. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. Ecología aplicada. 2(8):1-10.

Lopes JP, Gurgel HCB, Gálvez AO, Pontes CS 2007. Produção de cistos de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Crustacea: Anostraca). Biotemas. 2(20):33-39.

Lopes RB, Souza RF, Silva-Nicodemo SCT, Cruz JVF, Medeiros GF. 2018. Ecotoxicology of sediment in the estuary of the Jundiá and Potengi Rivers in Natal-RN, Brazil, by using *Leptocheirus plumulosus* as test-organism. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 13(2):77-84.

Maggio SA, Janney PK, Jenkins JJ. 2021. Neurotoxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon to *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 276(0):130120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130120>.

Maselli BS, Luna LAV, Palmeira JO, Barbosa S, Beijo LA, Umbuzeiro GA, Kummrow F. 2013. Ecotoxicidade de efluentes brutos e tratados gerados por uma fábrica de medicamentos veterinários. *Revista Ambiente & Água.* 8(2):1-12.

Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. 2018. Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research.* 140(0):41-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>.

Montagner CC, Vidal C, Acayaba R. 2017. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova.* 40(9):1094-1110. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>.

Quadra GR, Souza HO, Costa RS, Fernandez MAS. 2016. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environ Sci Pollut Res.* 24(2):1200-1218.

Sangion A, Gramática P. 2016. PBT assessment and prioritization of contaminants of emerging concern: pharmaceuticals. *Environmental Research.* 147:297-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.021>.

Santos LLS, Cahõ TB, Teixeira DIA, Ribeiro K, Brayner FA, Alves LC, Feitosa APS, Câmara FRA, Bezerra RS. 2019. A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta 1921) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching. *Aquaculture.* 512:734350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350>.

Santos VSV, Campos CF, Campos Júnior EO, Pereira BB. 2018. Acute ecotoxicity bioassay using *Dendrocephalus brasiliensis*: alternative test species for monitoring of contaminants in tropical and subtropical freshwaters. *Ecotoxicology.* 27(6):635-640. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-018-1951-3>.

Veiga LF, Vital N. 2002. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.* In: IA Nascimento, ECPM, Sousa, M Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo.p.111-122.

Verlicchi P, Aukidy MAI, Zambello E. 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment.:a review. *Science of the total Environment.* 429(0):123-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.

## Ensaio de toxicidade para avaliação de águas superficiais estuarinas usando *Nitocra* sp. como organismo-teste alternativo Toxicity tests for the evaluation of estuarine surface waters using *Nitocra* sp. as an alternative test organism

dos Santos Mendonça, Jaísa Marília<sup>1\*</sup>; Navoni, Julio Alejandro<sup>2</sup>; de Medeiros, Guilherme Fulgêncio<sup>3</sup>; Pinto Mina, Isabel Maria<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Norte — IFRN, Av. Senador Salgado Filho, 1559, Natal, RN 59015-000, Brazil <https://orcid.org/0000-0002-2352-008X>. <sup>2</sup>Postgraduate Program in Development and Environment at the Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil. <https://orcid.org/0000-0001-8715-0527>. <sup>3</sup>Federal University of Rio Grande do Norte — UFRN, Campus Universitário Lagoa Nova, 1524, Natal, RN 59078-970, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-5279-4725>. <sup>4</sup>Biology Department - School of Sciences, University of Minho (DB-ECUM), Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal <https://orcid.org/0000-0001-7365-6156>

\*[jaisa.mendonca@ifrn.edu.br](mailto:jaisa.mendonca@ifrn.edu.br)

Recibido: 04/02/2022

Aceptado: 26/07/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Resumo.** A crescente poluição de ambientes marinhos e estuarinos por descarga de efluentes é um problema mundial. Os ensaios ecotoxicológicos vêm sendo amplamente utilizados para monitorar os efeitos deste tipo de poluição e, atualmente são incorporados na legislação ambiental de diversos países, nomeadamente no Brasil. Contudo, são poucos os estudos realizados em áreas costeiras e a padronização de métodos com organismos nativos, representativos de ecossistemas locais, é insuficiente. *Nitocra* sp. tem sido eficientemente utilizado em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos e águas intersticiais, sendo necessário avaliar a sua adequação na análise de águas superficiais estuarinas. Amostras pontuais de água do baixo estuário Jundiaí-Potengi (EJP) foram coletadas mensalmente durante 18 meses, em áreas com (CE) e sem (SE) recepção de efluentes tratados. *Nitocra* sp. e *Mysidopsis juniae* (espécie padronizada) foram os organismos teste utilizados nos ensaios ecotoxicológicos. Efeitos letais (taxa de mortalidade) e subletais (taxa de reprodução) foram analisados considerando a caracterização microbiológica e físico-química das amostras testadas. Os teores de oxigênio dissolvido, salinidade, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio amoniacal e amoniacal total, nitrogênio total, óleos e graxas, sólidos suspensos e sedimentáveis, potássio total e coliformes termotolerantes determinados nas amostras CE e SE, traduzem diferentes níveis de poluição nos locais amostrados. As cartas-controle de *Nitocra* sp. e *M. juniae* indicaram boa reprodutibilidade laboratorial, e apesar dos organismos teste terem exibido diferentes perfis ecotoxicológicos, o aumento da taxa de mortalidade de ambos esteve associada à emissão de esgoto tratado. O uso de diferentes organismos teste favorece a representatividade dos ensaios ecotoxicológicos. Considerando o perfil de *Nitocra* sp. no monitoramento do EJP, o seu estabelecimento como organismo-teste padronizado necessita de mais estudos, incluindo a utilização de *nauplii* em bioensaios.

**Palavras chaves:** Ecotoxicologia; Copépodes; Efluentes domésticos; Estuário Jundiaí/ Potengi.

**Abstract.** Increasing pollution of marine and estuarine environments from wastewater discharge is a worldwide problem. Ecotoxicological tests are widely used to monitor the effects of this type of pollution and are currently being incorporated into the environmental legislation of several countries, including Brazil. However, few studies have been conducted in coastal areas, and standardization of methods with native organisms representative of local ecosystems is insufficient. *Nitocra* sp. has been efficiently used in ecotoxicological tests with sediments and interstitial waters, and its suitability for estuarine surface water analysis needs to be assessed. Point samples from the lower Jundiaí-Potengi estuary (JPE) in areas with (CE) and without (SE) discharge of treated effluents were collected monthly for 18 months. *Nitocra* sp. and *Mysidopsis juniae* (standardized species) were the test organisms used in the ecotoxicological assays. The lethal (mortality rate) and sublethal (reproduction rate) effects were analyzed considering the microbiological and physicochemical characterization of the tested samples. Dissolved oxygen, salinity, biochemical oxygen demand, ammoniacal and total ammoniacal nitrogen, total nitrogen, oils and greases, suspended and settleable solids, total potassium and thermotolerant coliform bacteria determined in samples from CE and SE, reflect varying levels of pollution at the sampled

sites. The control charts of *Nitocra* sp. and *M. juniae* indicated good reproducibility in the laboratory, and although the test organisms had different ecotoxicological profiles, the mortality rate of both organisms was related to the discharge of treated wastewater. The use of different test organisms increases the representativeness of the ecotoxicological tests. Given the profile of *Nitocra* sp. in JPE monitoring, further studies, including the use of *nauplii* in bioassays, are needed to establish it as standardized test organism.

**Keywords:** Ecotoxicology; Copepods; Domestic effluents; Jundiaí/ Potengi Estuary.

## 1. Introdução

A interpretação dos possíveis efeitos deletérios de efluentes sanitários e industriais na biota de ecossistemas estuarinos ainda recorre a indicadores tradicionais, limitando-se geralmente a parâmetros microbiológicos e físico químicos.

Os testes ecotoxicológicos avaliam o impacto da contaminação/ poluição em organismos teste constituindo uma aproximação realista das consequências da exposição de seres vivos a contaminantes (Kalloul *et al.* 2012). A importância dos testes ecotoxicológicos tem sido reconhecida pelos órgãos ambientais brasileiros, através da sua inserção nas resoluções de monitoramento ambiental exigidas pelo órgão federal regulador – Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 2005, 2011, 2012).

Assim, a implementação de uma abordagem ecotoxicológica para analisar a deterioração da qualidade da água em rios e regiões costeiras do Brasil é atual e vêm sendo incluída em estudos realizados em diferentes ecossistemas aquáticos (Pereira *et al.* 2015; Pimentel *et al.* 2016; Capparelli *et al.* 2021). Contudo, em particular na região nordeste do Brasil, são poucos os estudos realizados em áreas estuarinas (Nilin *et al.* 2013, 2019; Oliveira *et al.* 2014). A padronização das espécies de organismos teste utilizados em ensaios de toxicidade é essencial para, internacionalmente, se compararem resultados. Porém é importante assinalar que o uso de espécies-chave locais, aumenta a representatividade do ecossistema e a extrapolação dos resultados torna-se mais fiável (Martins e Bianchini 2011).

Os organismos a utilizar em testes de toxicidade devem: (i) ser sensíveis a diversos agentes químicos, (ii) ter um ciclo de vida curto, (iii) ser abundantes e com larga distribuição geográfica, (iv) ter estabilidade genética, (v) ser representativos de seu nível trófico e (vi) facilmente cultivados em laboratório (Zagatto e Bertolotti 2008). Invertebrados tais como crustáceos e moluscos vêm sendo muito usados em testes ecotoxicológicos simples ou envolvendo cadeias alimentares (Dahms *et al.* 2016). Porém, poucas espécies brasileiras são utilizadas, sobretudo para avaliar ambientes ma-

rinhos e estuarinos (Artal *et al.* 2019). O crustáceo (Malacostraca) *Misydopsis juniae*, padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011) para análise de águas salobras/ salinas, tem sido usado com sucesso para testar o efeito de diversos compostos químicos ou misturas complexas (Badaró-Pedroso *et al.* 2002), incluindo efluentes sanitários e industriais (Nicomede 2010) e amostras ambientais estuarinas (Nilin *et al.* 2019).

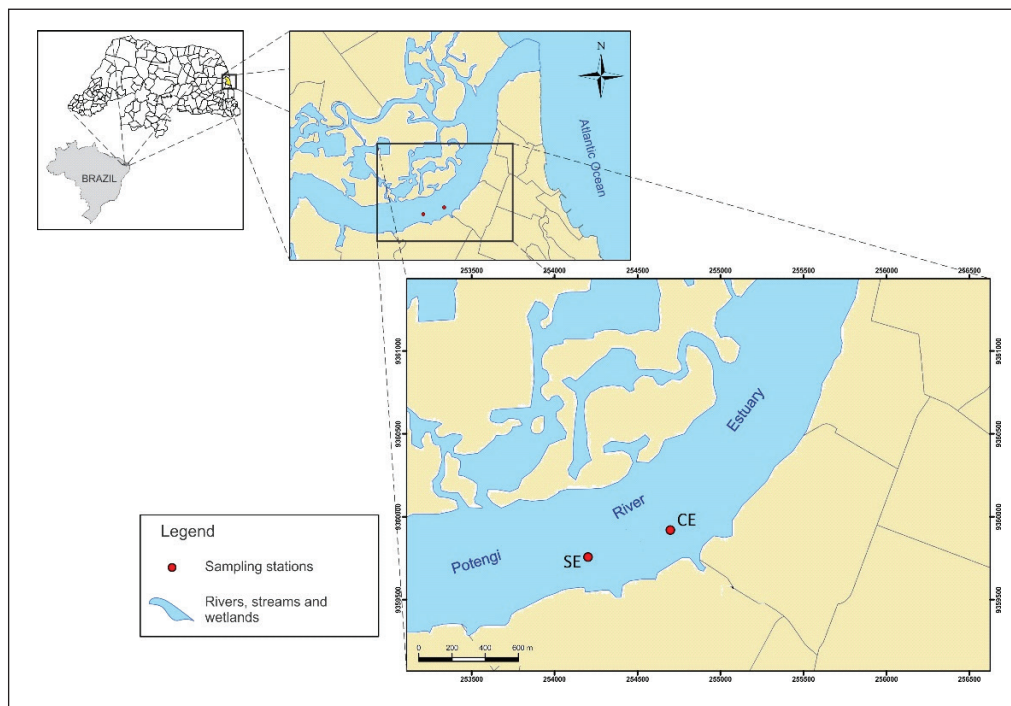
Em ensaios ecotoxicológicos de ambientes marinhos e estuarinos, também são usados certos copépodes que atendem as características supracitadas, além de serem de suma importância na cadeia alimentar, ligando os produtores (fitoplâncton) aos altos predadores, como camarões, peixes e até baleias (Lavorante *et al.* 2013; Kwok *et al.* 2015). Diferentes copépodes vêm sendo frequentemente utilizados como organismos teste em várias partes do mundo: *Acartia tonsa* (Kusk e Petersen 1997; Palma Lopes *et al.* 2018) e *Tisbe battagliai* (Diz *et al.* 2009) em diferentes países europeus; *Acartia sinjiensis* na Austrália (Gissi *et al.* 2013); *Nitocra spinipes* na Austrália e alguns países europeus (Simpson e Sapadaro 2011; Koch e Schamphelaere 2021; Moeris *et al.* 2021); *Quinquelaophonte* sp. na Nova Zelândia (Charry *et al.* 2018); *Tigriopus japonicus* em países orientais (Wong *et al.* 2020, Yu *et al.* 2020); *Tisbe biminiensis* em países da América do Norte e América do Sul (Araújo *et al.* 2013; Costa *et al.* 2014; Souza Santos *et al.* 2015); e *Nitocra* sp., utilizado principalmente com sedimentos no Brasil (Capparelli *et al.* 2021; Ferraz *et al.* 2021, Mendonça *et al.* 2021). Contudo, ainda não foi avaliada a utilização de *Nitocra* sp. no monitoramento ecotoxicológico de águas superficiais. Assim, o objetivo deste estudo incidiu na análise e argumentação do uso de *Nitocra* sp. como organismo teste na avaliação ecotoxicológica da qualidade de águas superficiais estuarinas. Nesse sentido os ensaios realizados com *Nitocra* sp. foram comparados com ensaios realizados com *Misydopsis juniae*, organismo teste padronizado para este tipo de amostras ambientais (ABNT 2011).

## 2. Material e métodos

### 2.1 Área de estudo e amostragem de águas superficiais

Amostras de água superficial do baixo estuário Junadiaí-Potengi (EJP) foram coletadas mensalmente entre junho de 2015 e dezembro de 2016, durante a maré baixa, em dois pon-

tos de amostragem (*Figura 1*): SE, situado a montante da estação de tratamento de esgoto (ETE) do Baldo ( $5^{\circ}47'21.70''S$ ,  $35^{\circ}13'11.18''O$ ) que não recebe esgoto tratado e CE, nas imediações da ETE, onde desagua o canal que recebe os efluentes tratados ( $5^{\circ}47'20.49''S$ ,  $35^{\circ}12'88.93''O$ ).



**Figura 1.** Geolocalização dos pontos de coleta de água superficial no complexo estuarino Junadiaí-Potengi (EJP), Natal/ RN: SE a montante de uma descarga de efluente tratado e, CE na zona de descarga do referido efluente.

### 2.2 Ensaios ecotoxicológicos

O microcrustáceo *Mysidopsis juniae* encontra-se em regiões marinhas costeiras e estuarinas do Brasil (Miyashita e Calliari 2016). De habitat bentônico, estes microcrustáceos medem cerca de 4 a 5 mm de comprimento e em laboratório têm um ciclo de vida de 28 a 30 dias. Testes ecotoxicológicos com *M. juniae* foram realizados seguindo o protocolo padronizado descrito na norma 15.308/2011 – Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT 2011). Em frascos de vidro de 500 mL prepararam-se triplicatas de 400 mL das diferentes concentrações da amostra ambiental: 100, 50, 25, 12,5% e controle negativo (0%). A cada frasco previamente preparado adicionaram-se 10 espécimes jovens de *M. juniae* (de 5 a 7 dias). As amostras de água estuarina foram mantidas nas seguin-

tes condições experimentais: salinidade -  $34 \pm 2$  ‰; temperatura -  $25 \pm 2$  °C; incubação - 96 h com fotoperíodo 12:12 h luz:escuro. Terminado o ensaio, contabilizaram-se os organismos mortos em cada frasco.

*Nitocra* sp. é um pequeno copépode (cerca de 1 mm) bentônico estuarino de fácil cultivo em laboratório com um ciclo de vida de cerca de 20 dias; estes copépodes sobrevivem em salinidades de 5 a 30 ‰ (Lotufo e Abessa 2002; Zaroni *et al.* 2012). Os testes com *Nitocra* sp. foram realizados seguindo o protocolo descrito por Lotufo e Abessa (2002) para águas intersticiais. Em frascos de polietileno com capacidade de 30 mL, colocaram-se em triplicata, 10 mL de cada concentração da amostra ambiental previamente preparadas (diluições de 50, 25, 12,5 e 6,25%, além do controle negativo). Em cada um destes frascos introduziram-se 10 fêmeas ovadas

de *Nitocra* sp. Todo o sistema experimental (15 frascos) foi incubado a  $25 \pm 2$  °C durante 96 h nas seguintes condições: salinidade -  $17 \pm 2$  ‰; fotoperíodo - 12:12h luz:escuro. A manutenção da salinidade das amostras foi ajustada por adição de salmoura ou de água destilada.

No final dos ensaios com *Nitocra* sp., as fêmeas vivas foram contabilizadas para determinar o efeito letal. Os náuplios que eclodiram em cada réplica foram fixados pela adição, a cada frasco, de formaldeído (10%) e corante rosa-bengala (0,1%), sendo a contagem feita ao estereomicroscópio (Coleman, modelo XTB-2B) para determinação da taxa de reprodução ( $n^\circ$  de náuplios por fêmea). A salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD) foram parâmetros determinados no início dos bioensaios nas diferentes concentrações. A toxicidade aguda expressa-se como sendo a concentração da amostra na qual a mortalidade dos organismos presentes é de 50% ( $CL_{50}$ -96h). Os dados expressos em  $CL_{50}$ -96h foram transformados em Unidades Tóxicas - UT (equação 1) de acordo com Bertolleti e Zagatto (2006).

$$UT = \frac{100}{LC_{50}} \quad (1)$$

O efeito subletal das amostras ambientais na reprodução de *Nitocra* sp. é expresso pela maior concentração na qual não se observa efeito (No Observed Effect Concentration - NOEC) e pela menor concentração na qual se observa efeito (Lowest Observed Effect Concentration - LOEC). A água do mar utilizada para cultivo e bioensaios foi coletada na praia da Via Costeira (alto mar;  $\pm 3$  km;  $\pm 35$  ‰), na cidade de Natal/RN, filtrada em sistema de carvão ativado e esterilizada por radiação ultravioleta (UV). A água assim tratada foi armazenada em barriletes de PVC (policloreto de vinila), com capacidade de 20 e 40 L, previamente higienizados e sob aeração.

O controle de qualidade dos ensaios e a viabilidade dos organismos teste foram avaliados mensalmente através de bioensaios utilizando como substâncias de referência, dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) para *Nitocra* sp. e sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) para *M. junia*, seguindo as recomendações da normativa 15.308 (ABNT 2011) e do protocolo descrito por Lotufo e Abessa (2002).

### 2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

Diferentes parâmetros físico-químicos para caracterização das amostras de água coletadas no EJP foram determinados de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 2012). O pH das amostras

de água foi determinado com um potenciômetro (modelo pH-Tec) e a salinidade (Sal, ‰) com um refratômetro (Vodex, vx100sg). O oxigênio dissolvido (OD,  $mg L^{-1}$ ) foi medido com um oxímetro digital portátil (*instrutherm* MO-900), e os valores determinados foram confirmados por titulação, sempre que possível. A quantificação ( $mg L^{-1}$ ) de Óleos e graxas (OG), sólidos suspensos (SS) e sólidos totais (ST) foi feita por gravimetria. Os sólidos sedimentáveis (SSe) foram determinados por sedimentação no cone *Imhoff*.

Após submeter as amostras a respectivamente, (i) um reagente combinado (ácido ascórbico, molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio), (ii) corante azo púrpura avermelhado, e (iii) solução alcalina de tartarato duplo de sódio e potássio, os teores em fósforo (P), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) foram determinados por colorimetria. Os teores em nitrogênio total (N), nitrogênio amoniacal ( $NH_3-N$ ), nitrogênio orgânico (NO), nitrogênio amoniacal total (NAT), demanda bioquímica de oxigênio ( $DBO_5$ ) foram determinados por titulação e o potássio (K) por fotometria de chama.

A detecção de coliformes totais (CT) e de coliformes termotolerantes (CTe) recorreu à técnica de tubos múltiplos, utilizando como meios de cultura, caldo verde brilhante bile 2% (CVVB) e caldo *Escherichia coli* (EC), que avaliam respectivamente, a presença de coliformes totais e termotolerantes.

### 2.4 Análise de dados

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados foram comparados com os valores de referência para águas salinas classe 2 presentes na resolução brasileira  $n^\circ$  357/2005 (CONAMA 2005).

O cálculo da  $CL_{50}$ -96h recorreu ao método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.* 1977), através do programa TOXTAT 3.5<sup>®</sup>. Os valores de NOEC e LOEC foram obtidos por análise de variância ANOVA *one way* para os resultados paramétricos, e para os não paramétricos foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis on Ranks*. A comparação post hoc entre grupos foi realizada utilizando o teste de *Dunnnett's* para dados paramétricos, e o método de *Dunn's* para os não paramétricos. O programa estatístico utilizado foi o *Statistic 7.0*.

A avaliação de *Nitocra* sp. como bioindicador de toxicidade de efeito letal (teste agudo) e subletal (teste crônico) das amostras de água superficial foram comparados com testes de toxicidade aguda normalizados pela ABNT 15.308/2011, que

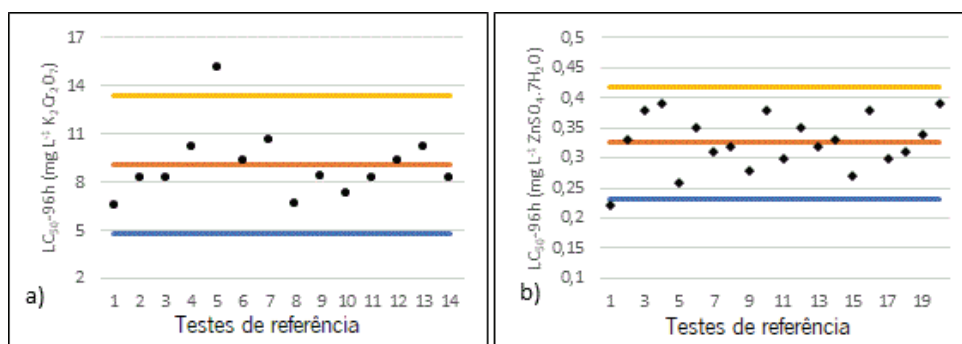
usam *Mysidopsis juniae* como organismo teste. Os resultados ecotoxicológicos analisados foram representados pela taxa de sobrevivência ou reprodução. O efeito observado nos ensaios foi calculado considerando a percentagem de sobrevivente e/ ou *nauplii* em relação ao grupo controle, ou seja, as taxas de sobrevivência e reprodução foram estimadas considerando o número de sobreviventes e de náuplios (respectivamente), contabilizados nas amostras ambientais diluídas de 1:2 em relação aos contabilizados no grupo controle. A análise estatística dos parâmetros ecotoxicológicos e físico-químicos recorreu ao teste U de Mann-Whitney e a amplitude do efeito

calculada mediante o coeficiente *d* de Cohen. O software utilizado foi o SPSS v26.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Cartas - controle

A sensibilidade dos organismos teste utilizados e a reprodutibilidade dos resultados foram avaliadas por testes de referência que permitiram a elaboração de cartas controle (Figura 2a e 2b). De acordo com as respectivas cartas controle, a LC<sub>50</sub>-96h para *Nitocra* sp. em K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> foi de 9,12 ± 2,35 mg L<sup>-1</sup> (n=14) e a LC<sub>50</sub>-96h para *M. juniae* em ZnSO<sub>4</sub> foi de 0,35 ± 0,04 mg L<sup>-1</sup> (n=18).



**Figura 2.** Cartas-controle de *Nitocra* sp. (a) e *M. juniae* (b). Concentração letal (LC<sub>50</sub>-96h) das substâncias de referência, respectivamente, dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O). Valor médio de LC<sub>50</sub>-96h - linha laranja; faixa de sensibilidade entre linhas amarela e azul (± 2 desvios padrão).

Contudo, no quinto teste de referência para *Nitocra* sp. a LC<sub>50</sub>-96h ultrapassou o limite superior estabelecido pela faixa de sensibilidade da carta controle do cultivo (Figura 2a), levando à suspensão dos testes com amostras ambientais até retorno da sobrevivência dos organismos teste, dentro da faixa de sensibilidade estimada (4,89 – 13,36 mg L<sup>-1</sup>), o que ocorreu já no sexto teste. A boa reprodutibilidade sugere que durante o período experimental, os dois organismos teste permaneceram saudáveis.

A LC<sub>50</sub>-96h determinada neste estudo para *Nitocra* sp. em K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (9,12 ± 2,35 mg L<sup>-1</sup>) foi cerca de duas vezes inferior a 15,94 ± 3,46 mg L<sup>-1</sup>, LC<sub>50</sub>-96h determinada por Krull *et al.* (2014). Para o copépode *Tisbe biminiensis*, a LC<sub>50</sub>-96h em K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> foi de 9,45 ± 1,68 mg L<sup>-1</sup> (Araújo-Castro *et al.* 2009) e de 10,5 ± 0,14 mg L<sup>-1</sup> (Régis *et al.* 2018), valores próximos aos determinados neste estudo para *Nitocra* sp.

Em testes de referência para avaliar a resposta de

*M. juniae* a sulfato de Zinco (ZnSO<sub>4</sub>) a LC<sub>50</sub>-96h foi de 0,35 ± 0,04 mg L<sup>-1</sup> (Nilin *et al.* 2019) e 0,33 mg L<sup>-1</sup> (Resgalla *et al.* 2021). Usando dicromato de potássio como substância de referência (de acordo com a norma adotada há mais de 10 anos pelo ECOTOX-Lab), a LC<sub>50</sub>-96h de *M. juniae* foi de 4,12 mg L<sup>-1</sup> (Resgalla *et al.* 2021), cerca de metade da LC<sub>50</sub>-96h determinada no presente estudo para *Nitocra* sp. com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, o que sugere a maior sensibilidade de *M. juniae* do que *Nitocra* sp. a esta substância de referência.

#### 3.2 Parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água superficial do baixo EJP coletadas nos pontos CE e SE (Tabela 1) foram determinados e confrontados com a resolução ambiental vigente (resolução n° 357/05, CONAMA 2005) para esse tipo de corpo hídrico.

O monitoramento de OD e DBO<sub>5</sub> em corpos hídricos é de grande importância já que ambos tem sido

relacionado com a mortalidade de organismos aquáticos (Munna *et al.* 2013; Matos *et al.* 2017). Relativamente a OD, em 50% das amostras SE e 80% das amostras CE foram determinados valores inferiores ao limite estabelecido de 5 mg L<sup>-1</sup> (CONAMA 357/ 05). Ao longo do período

monitorado, uma grande variabilidade nos níveis de DBO<sub>5</sub> foi observada (DP = 22,41 mg L<sup>-1</sup>). As concentrações de DBO<sub>5</sub> foram, em média, cerca de 7 vezes superiores em CE em relação a SE, sendo a diferença entre as amostras, significativa ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 1.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de parâmetros físico-químicos e microbiológicos de amostras de água superficial do estuário Jundiáí/ Potengi (n = 18) coletadas a montante da descarga do efluente tratado (SE) e na zona de descarga (CE), ao longo do período experimental (junho de 2015 e dezembro de 2016).

Parâmetro	Unidades	Pontos de amostragem		CONAMA (classe 2)	p -valor	Cohen d
		SE	CE			
OD	mg L <sup>-1</sup>	<b>4,79 <math>\pm</math> 1,48</b>	<b>3,35 <math>\pm</math> 1,85</b>	5,00	0,001	-0,727
pH		7,69 $\pm$ 0,59	7,57 $\pm$ 2,70	6,50 a 8,50	0,194	0,379
Sal(-)	‰	35,47 $\pm$ 3,36	16,69 $\pm$ 8,48	-	0,015	0,252
DBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	2,93 $\pm$ 1,96	20,42 $\pm$ 22,41	-	<0,001	0,272
SS	mg L <sup>-1</sup>	94,48 $\pm$ 75,63	96,35 $\pm$ 79,02	-	<0,001	0,785
SSe	ml L <sup>-1</sup>	0,10 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 1,96	-	<0,001	2,071
OG	mg L <sup>-1</sup>	3,01 $\pm$ 2,58	3,55 $\pm$ 2,52	-	<0,001	1,119
CTe	NMP/ 100 mL	<b>1x10<sup>5</sup> <math>\pm</math> 4 x10<sup>5</sup></b>	<b>16x10<sup>6</sup> <math>\pm</math> 30 x10<sup>6</sup></b>	2500	<0,001	0,947
NAT	mg L <sup>-1</sup>	0,56 $\pm$ 0,34	<b>8,44 <math>\pm</math> 5,39</b>	0,70	<0,001	-2.396
NH <sub>3</sub> -N	mg L <sup>-1</sup>	0,34 $\pm$ 0,26	7,38 $\pm$ 5,05	-	<0,001	0,849
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	<b>0,97 <math>\pm</math> 0,50</b>	<b>1,27 <math>\pm</math> 0,97</b>	0,70	0,685	0,302
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	0,02 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,49	-	0,136	0,287
N	mg L <sup>-1</sup>	1,56 $\pm$ 0,56	10,01 $\pm$ 5,50	-	<,001	1,952
P	mg L <sup>-1</sup>	0,08 $\pm$ 0,09	1,55 $\pm$ 1,39	-	0,122	0,925
K	mg L <sup>-1</sup>	494 $\pm$ 129	283 $\pm$ 208	-	0,014	0,314

<sup>(a)</sup>Não existe limite definido pela legislação.

A negrito, valores que ultrapassam os limites estabelecidos pela resolução CONAMA 357/ 2005 para águas salinas de classe 2.

A salinidade média das amostras SE foi de 35,47  $\pm$  3,36 ‰, correspondendo a valores que caracterizam águas salinas. Nesta região do baixo estuário EJP, Souza *et al.* (2010) e Lopes *et al.* (2018) determinaram valores de salinidade de 32 a 37 ‰ e 22 a 35 ‰, respectivamente. Nas amostras CE a salinidade média foi aproximadamente, metade da determinada em SE ( $p < 0,01$ ). A menor salinidade das amostras CE pode estar relacionada com a influência da variação da vazão da descarga de “água doce” da ETE do Baldo no rio Potengi. Considerados indicadores de poluição urbana devida à emissão de esgoto sanitário (Marins *et al.* 2007; Barletta *et al.* 2019; Nilin *et al.* 2019) os parâmetros SSe, CT, CTe, NA, NAT, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N e K, atingiram valores significativamente superiores em CE, mas apenas NAT e CT excederam os limites impostos pela legislação brasileira (CONAMA 2005). As concentrações de P não diferiram sig-

nificativamente, no entanto, o tamanho de efeito quando comparados os grupos foi considerado grande (cohen d = 0,925). Os nitratos excederam os limites impostos pela legislação em vigor nos dois pontos de amostragem. Apesar de, para os teores de nitrato não terem sido determinadas diferenças estatisticamente significativas entre SE e CE, em CE o teor de nitrato foi, em média, mais elevado.

Os teores de óleos e graxas (OG) não apresentaram diferença significativa entre os pontos SE e CE, e a análise visual, recomendada pela resolução n°357 (CONAMA 2005), não indicou a presença de OG. Na região portuária do EJP, a cerca de 1,6 km a jusante do ponto CE, Souza e Neto (2019) determinaram em 2016, teores médios (n = 30) de OG de 1,81 e 0,98 mg L<sup>-1</sup>, cerca de 2 a 3 vezes inferiores aos determinados nos pontos de amostragem analisados neste trabalho.

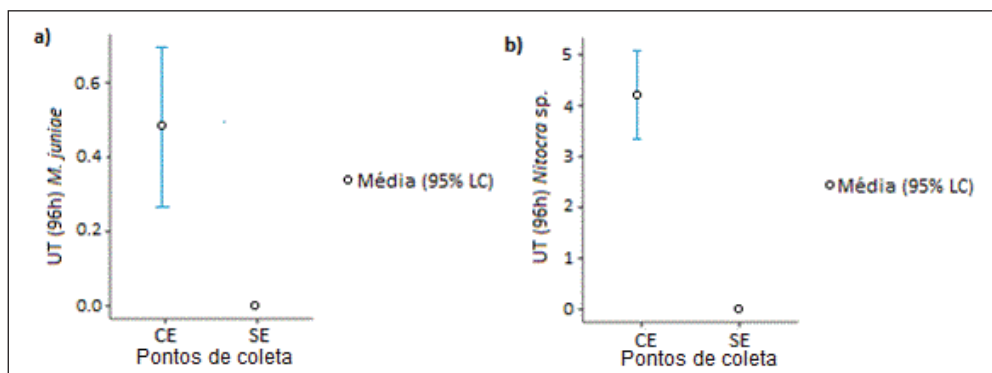


### 3.3 Bioensaios ecotoxicológicos

Entre os pontos CE e SE foram determinadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) para a toxicidade aguda expressa em unidades tóxicas (UT) para os dois organismos teste (Figura 3a e 3b). O efeito, expresso como coeficiente de Cohen d, foi de 1,82 UT para *M. juniaie* e de 0,85

UT para *Nitocra sp.*

As amostras CE (ponto receptor de efluente sanitário tratado), causaram efeito letal (mortalidade) em ambos os organismos teste, com um padrão de resposta diferenciado: *Nitocra sp.* evidenciou menor sensibilidade do que *M. juniaie* (Tabela 2).



**Figura 3.** Médias de Unidades tóxicas (UT) para *M. juniaie* (a) e *Nitocra sp.* (b), considerando as amostras de água superficial do baixo estuário do Jundiá/ Potengi ( $n=18$ ), coletadas a montante da ETE (SE) e na zona de descarga do efluente tratado (CE) entre junho de 2015 e dezembro de 2016. Limite de confiança (LC) = 95 %.

**Tabela 2.** Efeito letal ( $CL_{50}$ -96h, %) de amostras de água superficial do baixo estuário Jundiá/ Potengi, coletadas na zona de descarga do efluente tratado (CE) em *Mysidopsis juniaie* e *Nitocra sp.* e subletal (NOEC/ LOEC, %) em *Nitocra sp.*, durante o período amostral.

Ano	Mês	$CL_{50}$ -96h (%)		NOEC/ LOEC (%)
		<i>Mysidopsis juniaie</i>	<i>Nitocra sp.</i>	<i>Nitocra sp.</i>
2015	jun	<12,50 <sup>(1)</sup>	50	25/50
	jul	NT	NT	NT
	ago	<12,50 <sup>(1)</sup>	85	06/12,5
	set	34,67	56	-
	out	NT	-	-
	nov	31,93	48	
2016	dez	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	25/50
	jan	82,92	NT	50/100
	fev	12,5	NT	NT
	mar	28,65	NT	NT
	mai	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	50/100
	jun	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	NT
	jul	NT	NT	NT
	ago	29,1	61	50/100
	set	39,08	NT	NT
	out	14,18	NT	NT
	nov	32,42	NT	NT
	dez	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	25/50

NT: Não tóxico

- Teste não realizado

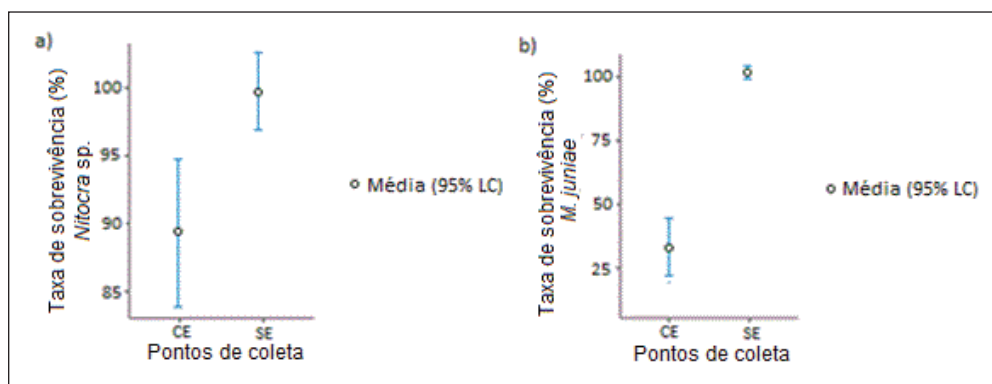
<sup>(1)</sup>  $CL_{50}$ -96h = < 12,5%, inferior à menor concentração testada

As amostras SE não causaram efeito letal nos organismos teste, exceto na amostra de janeiro de 2016; nesta amostra o número de *nauplii* de *Nitocra* sp. reduziu significativamente a partir da concentração 50% (LOEC = 50%), traduzindo-se em efeito subletal.

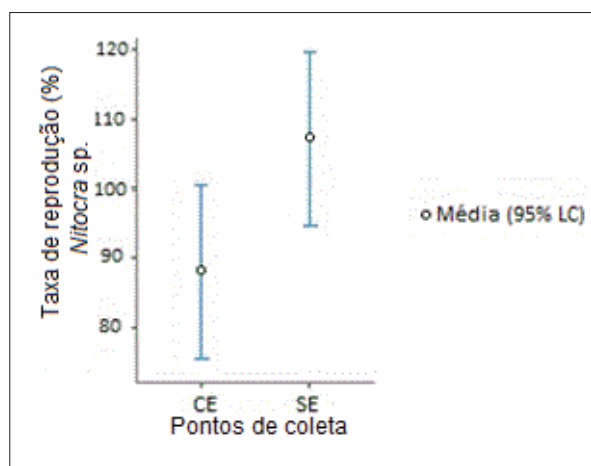
As taxas de sobrevivência de *M. juniae* e o *Nitocra* sp., também apresentaram diferenças significativas (Figura 4a e 4b); a taxa de sobrevivência média

de *Nitocra* sp. nas amostras CE foi de 89,4% e nas amostras SE de 99,5%. Para *M. juniae* a taxa de sobrevivência média foi de 33,5% e 102,3%, respectivamente nas amostras CE e SE.

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,03$ ) das médias da taxa de reprodução de *Nitocra* sp. (87,3% em CE e de 107,3% em SE) apontam para a influência negativa do efluente descartado em CE (Figura 5).



**Figura 4.** Taxas de sobrevivência média (%) de *Nitocra* sp. (a) e *M. juniae* (b) em amostras de água superficial do baixo estuário do Jundiá/ Potengi (n=18), coletadas a montante da ETE (SE) e na zona de descarga do efluente tratado (CE) entre junho de 2015 e dezembro de 2016. Limite de confiança (LC) = 95 %.



**Figura 5.** Taxa de reprodução média (%) de *Nitocra* sp. em amostras de água superficial do baixo estuário do Jundiá/ Potengi (n=17), coletadas a montante da ETE (SE) e na zona de descarga do efluente tratado (CE) entre junho de 2015 e dezembro de 2016. Limite de confiança (LC) = 95 %.

Não são muitos os estudos sobre a avaliação ecotoxicológica de águas superficiais de regiões estuarinas do Brasil (Araújo e Souza-Santos 2013; Nilin *et al.* 2019) e são ainda menos os realizados com águas superficiais do baixo EJP. Contudo

esta região é de extrema importância ambiental global e de subsistência para as populações ribeirinhas. Já se sabe que regiões que recebem efluentes sanitários e escoamentos da drenagem urbana convivem com o risco de ocorrência de

distúrbios bioquímicos e fisiológicos em sua biota (Silva e Abessa 2019). Gurgel *et al.* 2016 determinaram taxas de mortalidade de *M. juniae* seis vezes superiores às do grupo controle quando exposto a águas superficiais do rio Jundiaí, um afluente do EJP receptor de efluentes industriais. Ensaio ecotoxicológico com o sedimento do EJP, em pontos próximos da área estudada neste trabalho, relatam toxicidade aguda para *Tiburionella viscana* e *Leptocheirus plumulosus*, e crônica para *Nitocra* sp. e *Lytechinus variegatus* (Buruaem *et al.* 2013; Souza *et al.* 2016; Lopes *et al.* 2018). Mendonça *et al.* 2021 realizaram ensaios ecotoxicológicos com *Nitocra* sp. para avaliar a qualidade do sedimento do baixo EJP, e nenhuma das amostras coletas nas quatro campanhas de amostragem foi tóxica para os organismos teste, apesar das amostras terem apresentado elevada contaminação por metais e matéria orgânica. Ainda no EJP há registro de contaminação de ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* por metais Cd, Cr, Zn, Cu, Pb e Ni (Senez-Mello *et al.* 2020).

Estudos próximos a áreas de descarga de efluentes domésticos realizados em sedimentos ou em águas intersticiais (Araujo *et al.* 2013; Camargo *et al.* 2015; Campos *et al.* 2016; Ferraz *et al.* 2017), identificaram através do método de avaliação da identificação da toxicidade (AIT) metais, compostos voláteis, compostos orgânicos, surfactantes e amônia, como responsáveis pelos efeitos causados nos organismos. As elevadas concentrações de amônia determinadas no ponto CE do baixo EJP podem ter contribuído para a toxicidade destas amostras manifestada pela menor taxa de reprodução dos organismos teste. O uso de espécies nativas é de suma importância em bioensaios para monitoramento ambiental, uma vez que como representantes da biota local geram dados mais realistas, permitindo uma melhor avaliação da qualidade ambiental (Stringer *et al.* 2014). Assim é possível estabelecer valores limite para poluentes individuais utilizando espécies teste brasileiras (Artal *et al.* 2019).

No Brasil, o copépode estuarino *Nitocra* sp. está bem estabelecido como organismo teste em bioensaios ecotoxicológicos com sedimentos, por ser de fácil manuseio; contudo ainda não está padronizado para testes de toxicidade pelas normas brasileiras (Silva *et al.* 2018; Artal *et al.* 2019) e a referida espécie ainda não foi determinada. As duas espécies presentes no Brasil usadas nestes ensaios ecotoxicológicos responderam de modo diferente às amostras ambientais (águas superficiais do baixo EJP). A menor sensibilidade

de *Nitocra* sp. avaliando a letalidade pode estar associada a uma maior tolerância deste organismo à amônia não ionizada, considerada por Ferraz *et al.* 2021, um parâmetro adequado para avaliar a toxicidade das fases líquida ou sólida de uma matriz sedimentar. A presença de amônia em ambientes estuarinos não degradados é natural, e resulta do processo de decomposição da vegetação de manguezal e da excreção dos animais, sendo estimada em 0,2 mg L<sup>-1</sup> (Braga *et al.* 2000). O efeito tóxico da N-NH<sub>3</sub> naturalmente presente no estuário é menor do que a quantidade presente em efluentes sanitários.

Maior resistência de copépodes bentônicos ao anti-incrustante tributilestano em relação à menor resistência de copépodes planctônicos foi relatada por Costa *et al.* (2014). Estes autores relacionaram a maior resistência de copépodes bentônicos a um sistema de desintoxicação mais eficiente, eventualmente devido ao distanciamento filogenético entre estas taxa de diferentes nichos ecológicos.

Entretanto, em ensaios com corantes orgânicos dispersos, *Nitocra* sp. se mostrou mais sensível que o anfípodo *Parhyale hawaiiensis*, o que não ocorreu quando exposto ao metal zinco, apesar do resultado ter sido considerado similarmente responsivo (Artal *et al.* 2019). Os bioensaios que analisam efeitos subletais são muito mais sensíveis do que os que analisam efeitos letais, indicados para ambientes em que é necessária a proteção ambiental máxima (Stringer *et al.* 2014). É por isso necessário cuidado ao utilizar apenas *Nitocra* sp. para avaliar ambientes estuarinos.

O uso de náuplios do copépode *Tisbe biminiensis* em testes letais em vez de fêmeas ovadas e/ ou a observação da taxa de reprodução se mostrou mais sensível do que organismos adultos (Lavorante *et al.* 2013; Souza-Santos *et al.* 2015; Régis *et al.* 2018). Assim em futuros trabalhos o uso de náuplios de *Nitocra* sp. em área estuarina deverá ser considerado. Ferraz *et al.* (2021) utilizaram náuplios de *Nitocra* sp. com o objetivo de avaliar a toxicidade da água dos poros de sedimentos estuarinos próximos a um sistema portuário, porém como não utilizaram fêmeas ovadas não é possível comparar a sensibilidade dos náuplios com a de organismos adultos.

Na mesma linha, vêm sendo publicados estudos (Nicodemo 2010; Vaz *et al.* 2013) relatando o sucesso e propondo métodos que utilizam *M. juniae* em testes crônicos. Este organismo é ideal para águas estuarinas com salinidade próxima a 35 ± 2 ‰, como é o caso do baixo EJP, pois as amostras não precisam de ser diluídas.

Já *Nitocra* sp. pode ser utilizado para analisar amostras entre 5 e 30 ‰, faixa de sobrevivência da espécie determinada por Lotufo e Abessa (2002). Dada a gama de concentração de sais em que *Nitocra* sp. sobrevive, é possível a análise de um maior número de amostras ao longo do corpo hídrico em direção à nascente sem haver necessidade de aumentar a salinidade das amostras. No entanto, o cultivo experimental de *Nitocra* sp. no ECOTOXLab-UFRN em salinidade de 22 e 30 ‰ não apresentou o mesmo sucesso reprodutivo quando comparados a 17 ‰, salinidade final adotada para manutenção do cultivo e realização dos testes.

#### 4. CONCLUSÕES

Os copépodes do gênero *Nitocra* encontrados no Brasil têm sido cultivados com sucesso para ensaios ecotoxicológicos de sedimentos e águas intersticiais. A sobrevivência destes organismos em águas de salinidade inferior à da água do mar (salinidade ótima 17‰; salinidade máxima 30), torna-os bons candidatos a bioensaios para avaliação de ambientes estuarinos. Neste trabalho, *Nitocra* sp. foi usado como organismo teste na análise ecotoxicológica de amostras de águas superficiais do EJP. A boa reprodutibilidade dos ensaios realizados com a substância de referência (dicromato de potássio) também salienta o seu potencial como organismo teste. Nos ensaios com água superficial estuarina *Nitocra* sp. foi menos sensível às amostras receptoras de efluente tratado (CE) do que *M. juniae*, ou seja, apresentou maior taxa de sobrevivência. Mas considerando a diminuição da taxa de eclosão de náuplios de *Nitocra* sp., estes organismos teste foram consideravelmente sensíveis, sugerindo a importância da sua utilização juntamente com outras espécies de organismos. O uso simultâneo de diferentes organismos teste corroborará a representatividade dos efeitos da poluição e seus potenciais impactos na biota da área em estudo. O estabelecimento desta espécie brasileira como organismo teste padronizado para ensaios ecotoxicológicos de amostras de águas estuarinas superficiais, necessita de mais estudos, incluindo o uso de náuplios de *Nitocra* sp. na avaliação de toxicidade aguda e a determinação da espécie que tem vindo a ser utilizada no Brasil.

#### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao professor Denis Abessa, da UNESP (Universidade de São Paulo) e colaborador pesquisador do Instituto de Pesquisa Oceanográfica (Universidade de São Paulo), pela doação dos organismos de *Nitocra* sp. Ao

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio ao projeto [430383/2018-5].

#### REFERÊNCIAS

[ABNT] Brazilian Association of Technical Standardization. 2011. NBR 15308: Aquatic Ecotoxicology: Acute Toxicity - Test Method with Mysids (Crustacea). Rio de Janeiro, Brasil.

[APHA] American Public Health Association. 2012. Standard methods for the examination of water . 21th Washington D.C. American Public Health Associations.

Araújo-Castro CMV, Souza-Santos LP, Torreiro AGG, Garcia KS. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. Braz. J. Oceanogr. 57(1):33-41.

Araújo GS, Moreira LB, Morais RD, Davanzo MB, Garcia TF, Cruz ACF, Abessa DMS. 2013. Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixová-Japuí State Park, SP, Brazil). Marine Pollution Bulletin. 75(1-2):62-68.

Araújo CFC, Souza-Santos LP. 2013. Use of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* to assess water toxicity in the Suape industrial-port complex of Pernambuco, Brazil. Ecotoxicology and Environmental Safety. (89):212-221.

Artal MC, Santos A, Dornelas LL, Vannuci-Silva M, Vacchi FI, Albuquerque AF, Lotufo GR, Umbuzeiro GDA. 2019. Toxicity responses for marine invertebrate species of Brazilian occurrence. Ecotoxicology and Environmental Contamination. 14(1):15-25.

Badaró-Pedroso CMV, Reynier, VA Prósperi. 2002. Testes de toxicidade aguda em misidáceos-ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea). In: Nascimento IA, Sousa ECPM, Nipper M, editores. Métodos de ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda. pp. 123-139.

Barletta M, Lima ARA, Costa MF. 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. Science of the Total Environment. (651):1199-1218.

Bertoletti E, Zagatto P. 2006. Aplicações dos En-

saios Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In: Zaggato P, Bertolotti E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. Ed. Rima: São Paulo.

Braga ES, Bonetti CV, Burone L, Bonetti Filho J. 2000. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System–Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 40(2):165-173.

Buruaem LM, Araujo GS, Rosa PA, Nicodemo SC, Porto VF, Fonseca JR, Cruz JV, Medeiros GF, Abessa DMS. 2013. Assessment of sediment toxicity from the Areia Branca off-shore harbor and the Potengi river estuary (RN), northeastern Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 8(4):312-326.

Camargo JBDA, Cruz ACF, Campos BG, Araújo GS, Fonseca TG, Abessa DMS. 2015. Use, development and improvements in the protocol of whole-sediment toxicity identification evaluation using benthic copepods. *Mar Pollut Bull*. 91(2):511-517.

Campos BG, Cruz ACF, Buruaem LM, Rodrigues APC, Machado WTV, Abessa DMS. 2016. Using a tiered approach based on ecotoxicological techniques to assess the ecological risks of contamination in a subtropical estuarine protected area. *Sci Total Environ*. 544:564-573.

Capparelli MV., McNamara JC, Araujo GS, Cruz ACF, Abessa DMS. 2021. Use of an Integrated Geochemical and Ecotoxicological Approach to Evaluate Sediment Metal Contamination in Three Protected Estuarine Areas Along the Coast of São Paulo State, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*. 106(2):355-362.

Charry MP, Keesing V, Costello M, Tremblay LA. 2018. Assessment of the ecotoxicity of urban estuarine sediment using benthic and pelagic copepod bioassays. *PeerJ*. 6:e4936.

[CONAMA] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília: 2005 [Acessado em: 13 de agosto de 2021] Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>

[CONAMA] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Brasília: 2011 [Acessado em: 20 de agosto de 2021] Disponível em: [http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=627](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=627)

[CONAMA] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 454, de 01 de novembro de 2012. Brasília: 2012 [Acessado em: 20 de agosto de 2021] Disponível em: [http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=667](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=667)

Costa BVMD, Yogui GT, Souza-Santos LP. 2014. Acute toxicity of tributyltin on the marine copepod *Tisbe biminiensis*. *Brazilian Journal of Oceanography*. 62:65-69.

Dahms HU, Won EJ, Kim HS, Han J, Park HG, Souissi S, Raisuddin S, Lee JS. 2016. Potential of the small cyclopoid copepod *Paracyclopina nana* as an invertebrate model for ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*. 180:282-294.

Diz FR, Araújo CV, Moreno-Garrido I, Hampel M, Blasco J. 2009. Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*: lethal and reproductive endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(7):1881-1886.

Ferraz MA, Alves AV, Cássia MC, Pusceddu FH, Gusso-Choueri PK, Santos AR, Choueri RB. 2017. Sediment toxicity identification evaluation (TIE phases I and II) based on microscale bioassays for diagnosing causes of toxicity in coastal areas affected by domestic sewage. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36(7):1820-1832.

Ferraz MA, Alves AV, Choueri RB. 2021. A TIE Approach to Identify Substances Causing Sediment Pore Water Toxicity After a Major Fire at Fuel Storage Tanks in the Port of Santos (SE, Brazil). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 107(1):62-68.

Gissi F, Binet MT, Adams MS. 2013. Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis*: Optimisation and application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 97:86-93.

Gurgel MP, Navoni JA, Ferreira DM, Amaral VS. 2016. Ecotoxicological water assessment of an estuarine river from the Brazilian Northeast, potentially affected by industrial wastewater discharge. *Sci Total Environ*. 572:324-332.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*. 11(7):714-719.

- Kalloul S, Hamid W, Maanan M, Robin M, Sa-youty EH, Zourarah B. 2012. Source contributions to heavy metal fluxes into the Loukous Estuary (Moroccan Atlantic Coast). *Journal of Coastal Research*. 28(1):174-183.
- Koch J, De Schamphelaere KA. 2021. Making Sense of Life-History Effects of the Antidepressant Citalopram in the Copepod *Nitocra spinipes* Using a Bioenergetics Model. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 40(7):1926-1937.
- Krull M, Abessa DM, Hatje V, Barros F. 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106:195-203.
- Kusk KO, Petersen S. 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 16(8):1629-1633.
- Kwok KW, Souissi S, Dur G, Won EJ, Lee JS. 2015. Copepods as reference species in estuarine and marine waters. In *Aquatic Ecotoxicology*. Academic Press. 281-308.
- Lavorante BR, Oliveira DD, Costa BV, Souza-Santos LP. 2013. A new protocol for ecotoxicological assessment of seawater using nauplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 95:52-59.
- Lopes RB, Souza RF, Silva-Nicodemo SCT, Cruz JVF, Medeiros GF. 2018. Ecotoxicology of sediment in the estuary of the Jundiaí and Potengi Rivers in Natal-RN, Brazil, by using *Leptocheirus plumulosus* as test-organism. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 13(2):77-84.
- Lotufo GR, Abessa DMS. 2002. Testes de toxicidade com sedimentos total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento IA, Sousa ECPM, Nipper MG. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Artes Gráficas e Indústria Ltda: São Paulo. 151-162.
- Marins RV, Paula Filho FJD, Rocha CAS. 2007. Geoquímica de fósforo como indicadora da qualidade ambiental e dos processos estuarinos do Rio Jaguaribe-costa nordeste oriental brasileira. *Química Nova*. 30(5):1208-1214.
- Martins SE, Bianchini A. 2011. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *Journal of Environmental Monitoring*. 13(7):1866-1875.
- Matos MPD, Borges AC, Matos ATD, Silva EFD, Martinez MA. 2017. Modelagem da progressão da DBO obtida na incubação de esgoto doméstico sob diferentes temperaturas. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. 22:821-828.
- Mendonça JMS, Souza IS, de Medeiros GF, Mina IMCAP. 2021. Geochemical and ecotoxicological evaluation of sediments of a semiarid estuary on the northeast of Brazil (Natal / RN). *Reg Stud Mar Sci*. 43.
- Miyashita LK, Calliari D. 2016. Distribution and salinity tolerance of marine mysids from a subtropical estuary, Brazil. *Marine Biology Research*. 12(2):133-145.
- Moeris S, Vanryckeghem F, Demeestere K, Schamphelaere KA. 2021. A margin of safety approach for the assessment of environmentally realistic chemical mixtures in the marine environment based on combined passive sampling and ecotoxicity testing. *Science of The Total Environment*. 765:142748.
- Munna GM, Chowdhury MMI, Ahmed AM, Chowdhury S, Alom MM. 2013. A Canadian water quality guideline-water quality index (CCME-WQI) based assessment study of water quality in Surma River. *Journal of Civil Engineering and Construction Technology*. 4(3):81-89.
- Nicodemo SCT. 2010. Diagnóstico ecotoxicológico dos efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiaí/Potengi, Natal/RN [Master's thesis] Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Nilin J, Moreira LB, Aguiar JE, Marins R, Abessa DMS, Lotufo TMC, Costa-Lotufo LV. 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: the case of Ceará River, Northeastern Brazil. *Marine Environmental Research*. 91:89-96.
- Nilin J, Santos AAO, Nascimento MKS. 2019. Ecotoxicology assay for the evaluation of environmental water quality in a tropical urban estuary. *An Acad Bras Cienc*. 91(1): e20180232.
- Oliveira DD, Souza-Santos LP, Silva HKP, Macedo SJ. 2014. Toxicity of sediments from a mangro-

ve forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104:373-378.

Palma Lopes LF, Agostini VO, Guimarães SS, Muxagata E. 2018. Evaluation of the effect of antimicrobials in marine cultures, using the copepod *Acartia tonsa* as a bioindicator. *Chemistry and Ecology*. 34(8):747-761.

Pereira TDS, Moreira IT, Oliveira OM, Rios MC, Filho ACSW, Almeida M, Carvalho GC. 2015. Distribution and ecotoxicology of bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. *Mar Pollut Bull*. 99(1-2):166-177.

Pimentel MF, Damasceno ÉP, Jimenez PC, Araújo PFR, Bezerra MF, Morais PCV, Cavalcante RM, Loureiro S, Lotufo LVC. 2016. Endocrine disruption in *Sphoeroides testudineus* tissues and sediments highlights contamination in a northeastern Brazilian estuary. *Environ Monit Assess*. 188(5):298.

Régis CG, Souza-Santos LP, Yogui GT, Moraes AS, Schettini CAF. 2018. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 137:45-55.

Resgalla C, Silveira R, Vieira D, 2021. Acute Toxicity Assay Using Mysid as an Alternative Test Organism in the Assessment of the Aqueous Fraction of Sediment. *Ecotoxicology*. 30:2036-2042.

Senez-Mello TM, Crapez MAC, Ramos e Silva CA, Silva ET, Fonseca EM. 2020. Heavy metals bioconcentration in *Crassostrea rhizophorae*: A site-to-site transplant experiment at the Potengi estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Sci Rep*. 10246. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57152-w>

Silva ACM, Guimarães SS, Oliveira OMCD, Moreira ITA, Trigüis JA, Cruz MJM. 2018. Sensibilidade do copépode *Nitokra* sp. à exposição ao agregado óleo-material particulado em suspensão (OSA). *Geochimica Brasiliensis*. 32(1):47-61.

Silva AQ, Souza Abessa DM. 2019. Toxicity of three emerging contaminants to non-target marine organisms. *Environ Sci Pollut Res*. 26(18):18354-18364.

Simpson SL, Spadaro DA. 2011. Performance and sensitivity of rapid sublethal sediment toxicity tests

with the amphipod *Melita plumulosa* and copepod *Nitokra spinipes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(10):2326-2334.

Souza VM, Lazaro LM, Silva FS, Figueiredo Jr AG, Vital H, Frazão E. 2010. Benthic foraminifera and bacterial activity as a proxy for environmental characterization in Potengi Estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Anuário do Instituto de Geociências*. 33(1):20-34.

Souza JR, Neto MTC. 2019. Espacialização das manchas de óleo e graxa na zona portuária de Natal-RN através de técnicas de interpolação IDW e Krigagem. *Holos*. 8:1-14.

Souza IS, Araujo GS, Cruz ACF, Fonseca TGG, Camargo JBDA, Medeiros GF, Abessa DMS. 2016. Using an integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar Pollut Bull*. 104(1-2):70-82.

Souza-Santos LP, Oliveira DD, Lima ES. 2015. The use of epibenthic copepod *Tisbe biminiensis* nauplii to assess the toxicity of seawater samples in Suape Bay (state of Pernambuco; Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 10(1):61-69.

Stringer TJ, Glover CN, Keesing V, Northcott GL, Gaw S, Tremblay LA. 2014. Development of acute and chronic sediment bioassays with the harpacticoid copepod *Quinquelaophonte* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 99:82-91.

Vaz C, Kleine T, Tortelli TS, Böhm RFS, Spitzner EC, Gonçalves RA, Barros VG, Simm M, Oliveira TMN, Matias WG. 2013. Assessment of chronic toxicity in water samples from the Babitonga bay-south of Brazil-using transgenerational testing with *Mysidopsis juniae*. *Fresen Environ Bull*. 22(7):1967-1976.

Wong SW, Zhou GJ, Leung PT, Han J, Lee JS, Kwok KW, Leung KM. 2020. Sunscreens containing zinc oxide nanoparticles can trigger oxidative stress and toxicity to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Pollution Bulletin*. 154:111078.

Yu J, Tian JY, Xu R, Zhang ZY, Yang GP, Wang XD, Lai JG, Chen R. 2020. Effects of microplastics exposure on ingestion, fecundity, development, and dimethylsulfide production in *Tigriopus japonicus* (Harpacticoida, copepod). *Environmental Pollution*. 267:115429.

Zagatto PA, Bertoletti E. 2008. Aquatic Ecotoxicology: Principles and Applications. RiMa: São Carlos-Brasil.

Zaroni LP, Lotufo G, Gasparro MR, Souza ECPM. 2012. O copépodo *Nitocra* sp. como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos marinhos e estuarinos. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia.



## Caracterización y biomonitoreo de contaminantes orgánicos e inorgánicos en una zona ladrillera de San Luis Potosí

### Characterization and biomonitoring of organic and inorganic contaminants in a brick-making area of San Luis Potosí

Berumen-Rodríguez, Alejandra\*; Rodríguez Torres, Israel; Díaz de León-Martínez, Lorena; Díaz-Barriga, Fernando; Flores Ramírez, Rogelio.

Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, UASLP. Avenida Sierra Leona No. 550, CP 78210, Colonia Lomas Segunda Sección, San Luis Potosí, SLP, México. Celular: (52-444) 4131565; Oficina: 8262300 ext. 8471

\*aleberuambiental@gmail.com

Recibido: 27/04/2022

Aceptado: 23/05/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Resumen.** El sector ladrillero se caracteriza por la elaboración del ladrillo de forma artesanal donde utilizan técnicas rudimentarias, hornos de baja tecnología y diversos combustibles de poca calidad generando humos negros con gran cantidad de contaminantes. Por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar los metales en suelo, HAPs en aire y biomonitoreo de HAPs en trabajadores de la zona ladrillera "Las Terceras" San Luis Potosí, México. Con el fin de conocer la exposición laboral se determinó la concentración de HAPs en partículas  $PM_{10}$ , se caracterizó el suelo de la zona de trabajo y se realizó un biomonitoreo de metabolitos hidroxilados HAPs (OH-HAPs) en orina de los trabajadores. En aire se encontraron 14 de los 16 HAPs prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental en la fracción de  $PM_{10}$ , con una concentración media de  $5293,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (3,11-10510,81). Los resultados del análisis químico de los polvos mostraron que están constituidos principalmente de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) y arcillas ( $\text{SiAlOx}$ ) con presencia de óxidos de Fe-Ti, fosfatos de tierras raras (Lantano, Cerio, Neodimio Torio), silicatos de zirconio, sulfatos de bario, óxidos de zinc. En el biomonitoreo participaron 42 trabajadores ladrilleros, los resultados de la exposición a OH-HAPs en orina demostraron la media total de los OH-HAPs de 15,7 (6,92-195) ng/ml. Estos resultados muestran que el monitoreo ocupacional de las zonas ladrilleras es importante debido al escenario de riesgo y a las condiciones precarias de este trabajo, además de la alta exposición a contaminantes que afectan la salud de los trabajadores y sus familias, así como la propuesta de estrategias que ayuden a minimizar los impactos ambientales y prevenir los efectos en salud de las poblaciones.

**Palabras clave:** Ladrilleras; Metales; Polvo; Composición Química; Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

**Abstract.** The brick-making sector is characterized by artisanal brick production using rudimentary techniques, low-tech kilns and various low-quality fuels that generate black fumes with a large amount of pollutants. Therefore, the objective of this study was to characterize metals in soil, PAHs in air and biomonitoring of PAHs in workers of the "Las Terceras" brick area in San Luis Potosí, Mexico. In order to know the occupational exposure, the concentration of PAHs in  $PM_{10}$  particles was determined, the soil of the work area was characterized and a biomonitoring of hydroxylated PAH metabolites (OH-HAPs) in the urine of the workers was carried out. In air, 14 of the 16 PAHs prioritized by the Environmental Protection Agency were found in the  $PM_{10}$  fraction, with an average concentration of  $5293.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (3.11-10510.81). The results of the chemical analysis of the dusts showed that they are mainly constituted of quartz ( $\text{SiO}_2$ ) and clays ( $\text{SiAlOx}$ ) with presence of Fe-Ti oxides, rare earth phosphates (Lanthanum, Cerium, Neodymium Thorium), zirconium silicates, barium sulfates, zinc oxides. The biomonitoring involved 42 brick workers, the results of OH-HAPs exposure in urine showed the mean total OH-HAPs of 15.7 (6.92-195) ng/ml. These results show that occupational monitoring of brick-making areas is important due to the risk scenario and the precarious conditions of this work, in addition to the high exposure to pollutants that affect the health of workers and their families, as well as the proposal of strategies that help minimize environmental impacts and prevent health effects on populations.

**Key words:** Brick kilns; Metals; Dust, Chemical Composition; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

## Introducción

El crecimiento poblacional ha hecho que el ladrillo sea la materia prima más importante, por sus características que lo hacen idóneo para la construcción (Torres 2019). La composición del

ladrillo es importante para evitar el deterioro de las estructuras, sus características se han relacionado directamente con la resistencia y la durabilidad (Elert *et al.* 2003). Sin embargo, se ha evaluado

la posibilidad de la sustitución de materiales e innovación de tecnologías para el cuidado del ambiente y la salud (Enciso Urrego *et al.* 2014). Aunque este sector tiene gran impacto económico, su elaboración sigue siendo artesanal, se utilizan técnicas rudimentarias, hornos de baja tecnología y diversos combustibles de poca calidad como: basura electrónica, plásticos, llantas, madera, entre otros, que generan humos negros con gran cantidad de contaminantes (Rajarithnam *et al.* 2014) como partículas suspendidas de 10 y 2.5 micrómetros ( $PM_{10}$  y  $PM_{2.5}$ ), metales, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), dioxinas, y gases de efecto invernadero que afectan el ambiente y la salud de los trabajadores como de la población aledaña, incrementando su vulnerabilidad a enfermedades crónicas.

Los HAPs son compuestos formados por dos o más anillos fusionados de benceno (ATSDR 2013) que se clasifican en función de sus anillos estructurales como de bajo peso molecular (dos o tres anillos) y de alto peso molecular (los que tienen más de 4 anillos estructurales). Estos compuestos son relevantes para la salud y el ambiente por sus características cancerígenas y mutagénicas (IARC 2010). Los HAPs pueden permanecer largos periodos de tiempo en el suelo, y por su alta afinidad pueden encontrarse en partículas suspendidas, por lo que se puede transferir a los seres humanos con facilidad a través de la ingestión, inhalación o contacto dérmico (Barrán-Berdón *et al.* 2012). El proceso de combustión que tiene los hornos ladrilleros es a temperaturas de aproximadamente 800°C, fase incompleta que permite la liberación de HAPs directamente a la atmósfera, en especial los de mayor peso molecular y más cancerígenos (Barrán-Berdón *et al.* 2012).

Se ha estudiado la contaminación por HAPs en zonas industriales como agrícolas, sin embargo, en países en desarrollo como México la presencia de estas sustancias es preocupante por su generación en otro tipo de actividades; como la combustión de madera en interiores, eliminación de basura y la fabricación de ladrillos, actividades que con frecuencia se llevan a cabo en los patios de los hogares, exponiendo a las familias a este tipo de sustancias tóxicas.

En México de acuerdo con el Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas (2021), en el país hay 10.083 unidades económicas ladrilleras, aunque este número podría estar subestimado, debido a que es un trabajo precario que no está regulado, siendo uno de los trabajos más olvidados, mal remunerados y poco reconocidos (Ortiz Herrera *et al.* 2020). En México son pocos los es-

tudios en estas zonas (Berumen-Rodríguez *et al.* 2020). Por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar químicamente el polvo de los hornos, HAPs en aire y biomonitorio de HAPs en trabajadores de la zona ladrillera "Las Terceras" de San Luis Potosí, México.

### Metodología

La investigación es de corte transversal, dirigida a los trabajadores de la zona ladrillera "Las Terceras". El sitio se encuentra en la parte norte de San Luis Potosí, México (22°08'59"N 100°58'30"O) aproximadamente en la zona se encuentran alrededor de 130 hornos ladrilleros (Berumen-Rodríguez *et al.* 2020). El trabajo contó con la aprobación del comité de ética del estado de San Luis Potosí (SLP/-CEI-2018-002), cumpliendo con los principios éticos de Helsinki (AMM 2013). La participación de los trabajadores fue voluntaria y se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: 1) Trabajara en la zona ladrillera, 2) consentimiento informado, voluntario y firmado.

### Evaluación ambiental de HAPs en aire

Con el fin de conocer la exposición laboral se determinó la concentración de HAPs en partículas  $PM_{10}$  durante una semana laboral, del 28 de noviembre al 4 de diciembre de 2020, con un Hi-Vol a un flujo de 16,7 L/min a la altura del horno, en filtros de cuarzo durante 8 horas, para su análisis se siguió la metodología descrita por Bocanegra (2011), en tomar 1/3 del filtro de cuarzo y se le adicionan 30  $\mu$ L de pireno-d10 de 500 mg/L como estándar surrogado para determinar la pérdida de compuestos. Posterior se realizan dos procesos de extracción y se filtra para poder llevarlo al cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, analizando los 16 HAPs prioritarios por la EPA (ATSDR 2013).

Se estimó el riesgo a la salud humana, por la inhalación de HAPs contenidos en la fracción de partículas suspendidas mediante la concentración equivalente de Benzo(a)pireno (BaP) mediante el uso de un factor de toxicidad equivalente (TEF) valor asignado por la EPA (Agencia Protección Ambiental) y por La Goy (Nisbet y LaGoy 1992) para cada uno de los HAPs.

### Caracterización de polvos de hornos ladrilleros

Para las muestras de polvo se realizó un muestreo dirigido, se colectaron 3 muestras de polvo de los hornos que permitieron tener acceso. Para la obtención, se delimitó un área de 1 m<sup>2</sup> y con ayuda de una brocha se recolectó el material y almaceno en bolsas de polietileno. Posteriormente

te, la muestra se tamizó en una criba de acero inoxidable, recuperando partículas menores de 250  $\mu\text{m}$ .

Las muestras se montaron en un portamuestras con resina epoxídica (Buehler 20-8140-032) y, a continuación, se esmerilaron y pulieron con discos de papel abrasivo giratorios. A continuación, se recubrieron con una fina capa de oro y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (JEOL, JSM-6610LV). El microanálisis se realizó con espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS). Las muestras se caracterizaron bajo electrones retrodispersados para determinar la composición química y en modo secundario para observar la topografía superficial.

### Evaluación de exposición de OH-PAH en orina

Se les solicitó a los trabajadores la primera orina de la mañana, recolectada en botes de polipropileno y refrigeradas a  $-30^\circ$  hasta su análisis.

La evaluación de los HAPs se realizó mediante la evaluación de los metabolitos hidroxilados (OH-HAPs), con base en el método establecido por

la CDC con algunas modificaciones (CDC 2013; Díaz de León-Martínez *et al.* 2021). Esta técnica se lleva a cabo por medio de un Isotope Dilution Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). Analizando diez metabolitos hidroxilados: 1-hidroxinaftaleno (1-OH-NAP) y 2-hidroxinaftaleno (2-OH-NAP); 2,3 y 9-hidroxifluoreno (2-OH-FLU, 3-OH-FLU, 9-OH-FLU); 1,2,3 y 4-hidroxifenantreno (1-OH-PHE, 2-OH-PHE, 3-OH-PHE, 4-OH-PHE) y 1-hidroxipireno (1-OH-PYR), obtenidos de los laboratorios LCG standards (materiales de referencia del Dr. Ehrenstrofer). Como estándar interno se utilizó 25 ppb de  $^{13}\text{C}_6$  1-OH-PYR (Cambridge Isotope Laboratories).

### Resultados y discusión

#### Evaluación ambiental a HAPs en aire

En la *Tabla 1* se muestran las concentraciones de 14 de los 16 HAPs prioritarios por la EPA en la fracción de  $\text{PM}_{10}$ , con una concentración mediana de 99550,31  $\text{ng}/\text{m}^3$ , siendo los HAPs de 3 y 4 anillos los más abundantes de las muestras analizadas.

**Tabla 1.** Concentración de HAPs en aire ( $\text{ng}/\text{m}^3$ ) del ambiente de trabajo y equivalencias a BaP.

HAPs <sup>(1)</sup> n=6	Mediana (min-max) <sup>(2)</sup> $\text{ng}/\text{m}^3$	TEF <sup>(3)</sup>	BaP <sub>eq</sub> <sup>(4)</sup> $\text{ng}/\text{m}^3$
Naftaleno	3258,68 (1034,69-49640,97)	0,001	3,25
Acenaftileno	3015 (1505,03-75207,86)	0,001	3,01
Acenafteno	674,46 (26,21-20308,15)	0,001	0,67
Fluoreno	233,85 (94,96-29620,91)	0,001	0,23
$\Sigma$ Antraceno+Fenantreno	12718,69 (8342,22-2445719,17)	0,01	127,18
Fluoroantraceno	6284,02 (101,51-8411204,32)	0,001	6,28
Pireno	4870,11 (776,42-5122319,79)	0,001	4,87
$\Sigma$ Benzo(a)antraceno +Criseno	12426,97 (1528,02-4413631,68)	0,1	1242,69
$\Sigma$ Benzo(b)fluoranteno +Benzo (a)pireno	33013,55 (308,71-3947638,77)	1	33013,55
$\Sigma$ Indeno(1,2,3-CD) pireno+Benzopirileno	95437,30 (6,66-1347478,60)	0,1	9543,73
<b><math>\Sigma</math>14HAPs</b>	<b>99550,31 (3117,22-10510813,15)</b>		<b>43945,46</b>

<sup>(1)</sup>HAPs Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, <sup>(2)</sup>Min-max mínimo-máximo, <sup>(3)</sup>TEF Factor equivalente tóxico, <sup>(4)</sup>BaP<sub>eq</sub> equivalencia a Benzo (a) Pireno.

Según la Organización Internacional del Trabajo (OIT) cada año mueren 2,3 millones de trabajadores a causa de un accidente o enfermedad relacionada con el trabajo, además 313 millones de trabajadores sufren de lesiones no mortales cada año, lo que implica un impacto económico de seguridad y salud en el trabajo (OIT 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el

30 % de los trabajos tiene problemas de calidad de aire, trayendo como consecuencias directas efectos en la salud. Por lo que, se han generado reportes para la prevención de los factores ambientales para favorecer el establecimiento de directrices con el fin de tener un control de la contaminación del aire y prevenir efectos en la salud de los trabajadores (OIT 2001; 2017). Estas

regulaciones no siempre se cumplen en todos los trabajos y menos en las ocupaciones precarias: ausentes de regulaciones, vigilancia y servicios de seguridad social, como lo es el sector ladrillero. Para evaluar si las concentraciones de HAPs encontradas en este estudio representan un riesgo potencial para la salud de los trabajadores, se compararon los niveles de HAPs con los valores de referencia por inhalación (RfC) propuesto por la EPA de 2 ng/m<sup>3</sup> el cual protege contra efectos en el desarrollo embrionario y con el de la Unión Europea en PM<sup>10</sup> de 1 ng/m<sup>3</sup> valor establecido con base a un indicador de riesgo carcinogénico de los HAPs (ATSDR 2013). El valor obtenido por equivalencia a BaP fue de 43945,46 ng/m<sup>3</sup> el cual supera por encima los valores de referencia, indicando riesgo y posibles efectos a la salud en los trabajadores del ladrillo.

La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) estableció un límite para exposición a HAPs por metro cubico de aire de 0,2 mg/m<sup>3</sup> y un límite de exposición permisible (PEL) en jornada

laborales de 8 horas para emisiones de aceite mineral de 5 mg/m<sup>3</sup> y para hornos de coque y de brea de alquitran de hulla con una media de 0,1 mg/m<sup>3</sup>, los valores máximos de este estudio son superados 2 veces por los límites permisibles de esas ocupaciones. Estas ocupaciones son monitoreadas por la preocupación de exposición a contaminantes lo que ha llevado a desarrollar gran cantidad de investigaciones y directrices, el sector ladrillero deberá ser considerado dentro de estas. Se detectaron industrias donde se ha evaluado los HAPs en aire como lo son: los hornos de coque, de alquitran de hulla, fabricación de hierro y acero, fábrica de aluminio y fundiciones, fabricación de electrodos de carbono y la fabricación de asfalto (Tabla 2), estos estudios han logrado que se les brinde a los trabajadores equipo de protección, vigilancia, control y monitoreo. Este trabajo, demuestra que la actividad ladrillera tiene niveles muy parecidos de exposición a estas ocupaciones y que no se ha considerado dentro de labores de alto riesgo.

**Tabla 2.** Niveles de  $\Sigma$ HAPs en aire en 8 h de trabajo ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Comparación con valores publicados en literatura científica.

Sector	n	Media	Rango	Referencia
Ladrilleras	6	5293,05	3,11-10510,81	Este estudio
Hornos de Coque	104	2,77	-	(Vimercati et al. 2020)
Bomberos	24	2,72	0,64-8,1	(Robinson et al. 2008)
Hornos de coque <sup>(1)</sup>	40	55,73	315,97-1678,83	(Roszbach et al. 2007)
Electrodos de grafito <sup>(1)</sup>	92	15,79	226,82-1848,37	
Producción refractarios <sup>(1)</sup>	123	38,15	364,80-2764,96	
Hornos de Coque	11	79,17	8,80-184,55	(Unwin 2006)
Hornos de Coque	13	70,66	9,93-294,63	(Unwin 2006)
Destilación de alquitran	12	278,82	51,9-1130,21	(Unwin 2006)
Revestimiento y envoltura de tuberías	11	263,64	73,34-758,22	(Unwin 2006)
Destilación del petróleo Fundición	8	68,94 1165,75	15,21-280,03 26,97-120,13	(Unwin 2006) (Unwin 2006)
Trabajadores de granulación húmeda	8	-	386-3670	(Tsai et al. 2002)
Trabajadores del embalaje	22	-	471-4810	
Planta de piedra resistente al fuego	4	12,63	0,71-36,91	(Gündel et al. 2000)

<sup>(1)</sup>Los valores presentados son mediana (percentil 95-máximo).

BaP se ha utilizado como marcador importante de la exposición de HAPs en lugares de trabajo, este HAP cuenta con mayor número de estudios y por ende mayor cantidad de información disponible sobre sus efectos, por lo que también se utiliza su concentración de referencia (RfC). Se ha visto

que la asociación del BaP con los compuestos de 4-6 anillos se ve correlacionada y por eso se ha ocupado al BaP como marcador eficaz para la salud ocupacional (Fertmann *et al.* 2002). Los HAPs encontrados son preocupantes por la alta presencia de BaP en el 80% de las sustancias

analizadas, clasificado como cancerígeno para los humanos (grupo 1 de la IARC) (IARC 2010). Scobbie (1998) demostró que el siguiente paso para vigilar la exposición a HAPs es la medición de las sustancias individualmente, sin embargo, existen pocos límites de exposición laboral para los HAPs individuales. Por lo contrario, Unwin (2006) propone evaluar a los HAPs en conjunto de compuestos podría ser más adecuado para una evaluación de riesgos basada en toxicología, ya que no todos tienen una actividad carcinógena. El Ejecutivo de Salud y Seguridad (HSE) utilizó a nueve HAPs entre los compuestos con potencial cancerígeno para representar una medida de exposición total a HAPs (Department of Health 1994). Evaluar los 16 HAPs prioritarios permite conocer el comportamiento de la exposición ocupacional y por ende comprender las mezclas y efectos que se generan en el trabajador. Además, se ha visto que la evaluación de la exposición de HAPs en aire no basta para determinar el riesgo en los trabajadores (Unwin *et al.* 2006), por lo que el biomonitoreo es importante para determinar las mezclas de HAPs en el metabolismo.

### Biomonitoreo de OH-HAPs

En el biomonitoreo participaron 42 trabajadores ladrilleros, los resultados de la exposición a OH-HAPs en orina demostraron que el 100% de los trabajadores presentaron los biomarcadores. La suma total de los OH-HAPs de 15,7 (6,92-195) ng/ml (Tabla 3).

**Tabla 3.** Concentraciones de OH-HAPS en orina de ladrilleros (ng/mL)

OH-HAPS	Ladrilleros (n=42) Mediana (min-max) <sup>(2)</sup>	> %LOD <sup>(1)</sup>
1-OH-PYR	1,56 (1,20-2,97)	92,8
4-OH-PHE	1,76 (1,36-2,07)	30,9
2-OH-NAP	2,82 (2,26-3,5)	90,4
1-OH-NAP	1,96 (1,24-3,56)	92,8
9-OH-FLU	187,3 (109,1-220)	45,2
3-OH-FLU	1,74 (1,03-2,18)	28,5
2-OH-FLU	0,75 (0,60-1,50)	42,8
3-OH-PHE	1,01 (0,66-1,46)	23,8
1-OH-PHE	0,74 (0,44-0,99)	30,9
2-OH-PHE	0,95 (0,77-1,76)	14,3
Σ-OH-HAPS	15,7 (6,92-195)	95,8

<sup>(1)</sup>LOD límite de detección del método - <sup>(2)</sup>Min-máx. mínimo-máximo

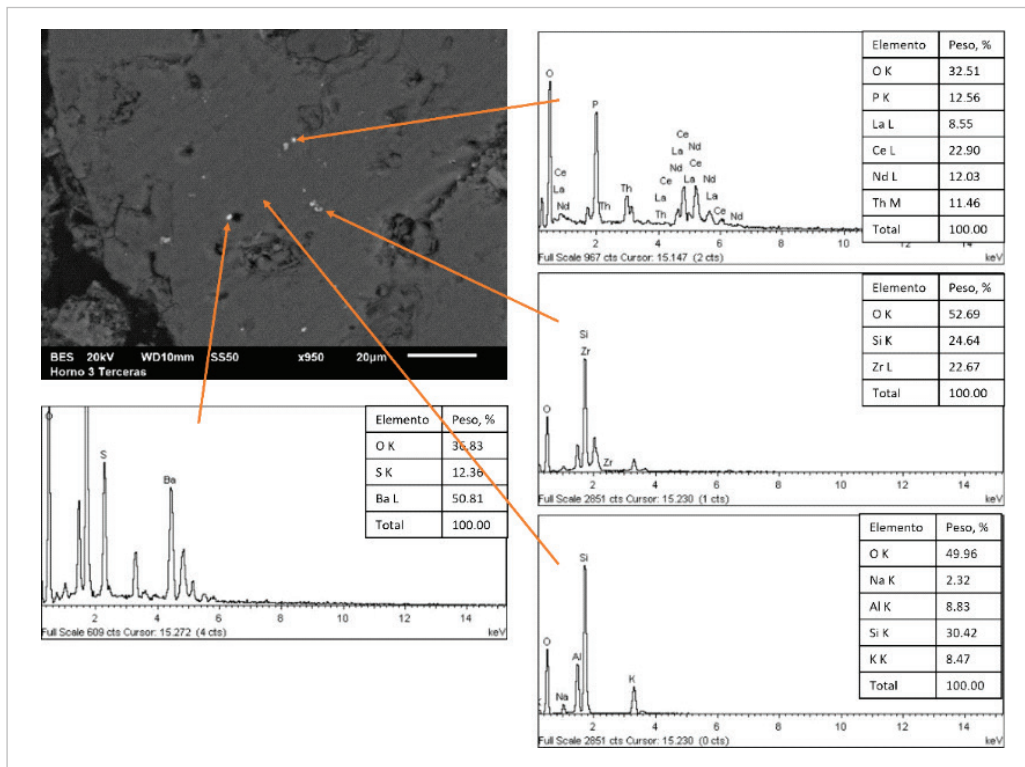
Los resultados indican la alta exposición a HAPs debido a la presencia de los diez metabolitos encontrados. Los metabolitos encontrados con mayor

frecuencia fueron 1-OH-PYR, 1-OH-NAP Y 2-OH-NAP presentes en más del 90 % de los trabajadores. La presencia de estos compuestos indica que la vía de ingreso al organismo es inhalatoria por el bajo peso molecular que los diferencia de los otros compuestos. El naftaleno de este estudio se podría deber al tipo de combustibles como aceite usado utilizado en las zonas ladrilleras. El naftaleno se ha considerado como un carcinógeno potencial y también puede ser usado como un marcador de exposición de HAPs en los lugares de trabajo. Según Unwin (2006), el naftaleno es uno de los mayores representantes de los HAPs entre el 50-90 % en los lugares de trabajo, por lo que la EPA lo ha declarado como uno de los contaminantes atmosféricos más peligrosos (Kamal *et al.* 2011). El 1-OH-PYR es el metabolito del pireno y ampliamente ha sido utilizado como biomarcador de los HAPs en lugares de trabajo. Nuestros resultados indican que se detectaron niveles de este metabolito en todos los participantes, se observó que el 98 % de los participantes presentaron niveles mayores a los establecidos por (Jongeneelen 2001) de 0,24 μmol/mol Cr para personas ocupacionalmente no expuestas y no fumadoras. Se propuso el límite de 2,5 μg/L de exposición biológica para personas expuestas al término de la jornada laboral semanal, siendo nuestros valores máximos más altos a este valor, al término del día laboral. Asimismo, Jongeneelen (2014) propuso el valor de 1,9 μmol/mol Cr que oriente a trabajadores expuestos y que presentan efecto genotóxico en linfocitos, el cual el 18 % de los trabajadores están por encima de este valor que indica posibles efectos para la salud. La presencia de los metabolitos en orina indica que se están metabolizando los HAPs encontrados en aire. La exposición laboral a los hidrocarburos está considerada dentro de la IARC (Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer) como cancerígena del grupo 1 por ocupaciones de riesgo como gasificación del carbón, producción de aluminio, producción de coque y pavimentación de carreteras (WHO & ILO 2021), el sector ladrillero no se encontró dentro de la clasificación. Los resultados de este estudio muestran similitud en la exposición de HAPs con las ocupaciones monitoreadas por las agencias internacionales en hornos de coque, alquitrán de hulla, aceites y carbón negro (Kang *et al.* 2002; Rossella *et al.* 2009; Tsai *et al.* 2002; Unwin *et al.* 2006; Vimercati *et al.* 2020). Se ha demostrado que la exposición a los HAPS puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de efectos para la salud de los trabajadores asociados principalmente con marcadores de inflamación respiratoria (Barraza-Villarreal *et al.*

2015), riesgos a enfermedades cardiovasculares, diabetes, dislipidemias, efectos inmunotóxicos y daño genotóxico (Poursafa *et al.* 2017).

**Caracterización de suelos de hornos ladrilleros**  
Los resultados del análisis químico de los polvos

hornos ladrilleros mostraron que están constituidos de cuarzo (SiO<sub>2</sub>) y arcillas (Sial Ox) con presencia de óxidos de Fe-Ti, fosfatos de tierras raras (lantano, cerio, neodimio torio), silicatos de zirconio, sulfatos de bario, óxidos de zinc (Figura 1).



**Figura 1.** Caracterización de polvos de hornos ladrilleros de la zona de "Las Terceras", San Luis Potosí, México.

La arcilla encontrada es la materia prima para la elaboración del ladrillo, sus partículas sólidas al ser mezcladas con agua vuelven a este material maleable, para dar la forma al ladrillo y al perder el agua este se endurece permanentemente, ladrillo que se forma químicamente de silicatos (Norma 2005). Este tipo de compuestos hacen que el ladrillo pueda resistir la humedad y el calor. Las muestras presentaron concentraciones altas de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y TiO<sub>2</sub> con porcentajes de 45%, óxidos que son los elementales para la coloración rojiza del ladrillo, color que se adquiere hasta los 700°C, lo que indica que las arcillas no tendrán tonalidad blanquecina color que se obtiene al tener menos del 1% de óxido de hierro (Norma 2005). En los resultados se encontró adherido el óxido de fierro al óxido de zinc, unión que se caracteriza por tener una resistencia a la corrosión y a los rayos UV (Kiomarsipour *et al.* 2013). La

aplicación de óxido de zinc genera una gama de tonalidades para las arcillas, generando ladrillos utilizados principalmente en las fachadas. La aparición de los óxidos en las zonas ladrilleras son comunes para dar tonalidad a las arcillas e influye en los procesos de sinterización de los materiales. Tomar en cuenta la caracterización de los materiales podría influir en la regulación de la temperatura de los hornos y tiempo de cocción (Roa-Bohórquez *et al.* 2019). Diversas investigaciones han demostrado que la composición química de los ladrillos indica principalmente altas cantidades de cuarzo, óxidos de zinc, silicatos, arcillas, óxidos de hierro y calcio, congruente con lo encontrado en este estudio (Elert *et al.* 2003; Zea 2005; Roa-Bohórquez *et al.* 2019; Soto y Sánchez 2017). Los compuestos encontrados son idóneos para la fabricación de ladrillos por su plasticidad, volumen, densidad,

color, resistente a grandes cambios de temperaturas (Soto y Sánchez 2017).

Sin embargo, en esta zona ladrillera se encontraron otros elementos de la familia de los lantánidos, conocidos por estar estrechamente unidos y no se pueden separados. Elementos que son utilizados principalmente en la industria de la tecnología como: la industria automotriz, petroquímica, aleaciones, energía eléctrica, imanes, teléfonos móviles (Santos y Vera 2019), estos podrían ser ocupados por los trabajadores para generar otras fuentes de empleo.

El estudio presenta a su vez debilidades al ser un estudio transversal y piloto, número de muestras reducidas, ausencia de valores de corte que pueda indicar efecto. Sin embargo, los altos niveles de HAPs en aire y de OH-HAPs en orina de los trabajadores indican un escenario de alto riesgo, por lo que debe tomarse en cuenta para realizar intervenciones en los trabajadores del sector ladrillero, dichas intervenciones podrían basarse en la caracterización del material que se está utilizando y poder disminuir los impactos en salud y ambiente.

### Conclusión

En los hornos ladrilleros se encontraron altos niveles de HAPs en aire, dominados por HAPs de 4-6 anillos, se observó que estos niveles son similares a los límites de exposición de labores de alto riesgo, monitoreada y reguladas por agencias internacionales. A su vez, se observaron altos niveles de OH-HAPs, lo que podría indicar que los humos liberados en los hornos de trabajo están siendo metabolizados por los trabajadores. Además, al abordar la caracterización química de los elementos que hay en la zona de trabajo, se tiene un potencial para buscar alternativas de trabajo y materiales sostenibles.

Por lo que el sector ladrillero deberá ser tomado como un centro laboral sostenible donde se debe tomar como pilar fundamental la salud laboral con condiciones de trabajo justas, evitando trabajos precarios como en el que se encuentra los trabajadores ladrilleros con falta de acceso a servicios de salud, servicios sanitarios, largas jornadas laborales y salarios bajos, aunado a lo anterior se encuentran expuestos a sustancias tóxicas parecidas a las de ocupaciones reguladas con límites de exposición internacionales, por lo que debe considerarse a la ocupación ladrillera dentro de las labores de alto riesgo cancerígeno con el propósito de prevención, control y vigilancia para la protección de la salud promoviendo el trabajo decente que permita seguridad ambiental y laboral.

Agradecimientos. Los autores agradecen las ayudas y becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Investigación Sectorial FOSEC SS/IMSS/ISSSTE # A3-S-38681.

### Bibliografía

[AMM] Asociación Médica Mundial. 2013. Declaración de Helsinki de la AMM-Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.

[ATSDR] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades]. 2013. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). [citado el 23 enero 2022]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/polycyclic-aromatic-hydrocarbons/standards-and-regulations-for-exposure.html>

Barrán-Berdón A, García-González V, Pedraza-Aboytes G, Rodea-Palomares I, Carrillo-Chávez A, Gómez-Ruiz H, Cuellar Verduzco B. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from a brick manufacturing location in central México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28(4):277-288.

Barraza-Villarreal A, Escamilla-Nuñez M, Schilman A, Hernandez-Cadena L, Li Z, Romanoff L, Sjödin A, Río-Navarro D, Díaz-Sánchez D, Díaz-Barriga F, Sly P, Romieu I. 2015. Lung Function, Airway Inflammation, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure in Mexican Schoolchildren: A Pilot Study. *J Occup Environ Med*. 56(4):415-419. <https://doi.org/10.1097/JOM.000000000000111>

Berumen-Rodríguez A, Pérez-Vázquez F, Díaz-Barriga F, Márquez-Mireles L, Flores-Ramírez R. 2020. Environmental and human health effects caused by the Mexican bricks factories. *Salud Pública Mex*. 63(1):100-108. <https://doi.org/10.21144/11282>

[CDC] Centers of Disease Control and Prevention. 2013. Laboratory Procedure Manual Monohydroxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (OH-PAHs) Isotope Dilution Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS).

Díaz de León-Martínez L, Flores-Ramírez R, Rodríguez-Aguilar M, Berumen-Rodríguez A, Pérez-Vázquez F, Díaz-Barriga F. 2021. Analysis of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in precarious workers of highly exposed occupational scenarios in Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*. 28(18):23087-23098. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12413-y>

Elert K, Cultrone G, Rodríguez Navarro C, Sebas-

tián Pardo E. 2003. Durability of bricks used in the conservation of historic buildings influence of composition and microstructure. *Journal of Cultural Heritage*. 4(2):91–99. [https://doi.org/10.1016/S1296-2074\(03\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S1296-2074(03)00020-7)

Enciso Urrego L, Pacheco D, Rivera D, Guerrero Useda M. 2014. Análisis de factores de riesgo en trabajadores de ladrilleros de Ubaté. *IIEC*. 3(3):5-10.

Fertmann R, Tesseraux I, Schumann M, Neus H. 2002. Evaluation of ambient air concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in Germany from 1990 to 1998. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 12:115–123. <https://doi.org/10.1038/sj/jea/7500206>

Gündel J, Schaller K, Angerer J. 2000. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenz(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene. *Int Arch Occup Environ Health*. 73(4):270-274.

Department of Health. 1994. Committees on toxicity, mutagenicity, carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment. [citado 28 de enero 2022] Disponible en: <https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/cotcomco-annualreport1994.pdf>

[IARC] Agency for Research on Cancer. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 92:1-853.

Jongeneelen F. 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Annals of Occupational Hygiene*. 45(1):3–13. [https://doi.org/10.1016/S0003-4878\(00\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0003-4878(00)00009-0)

Jongeneelen F. 2014. A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology Letters*. 231(2):239–248. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.05.001>

Kamal A, Qayyum M, Cheema I, Rashid A. 2011. Biological Monitoring of Blood Naphthalene Levels as a Marker of Occupational Exposure to PAHs among Auto-Mechanics and Spray Painters in Rawalpindi. *BMC Public Health*. 11(1):467. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-467>

Kang J, Cho S, Kim H, Lee C. 2002. Correlation of urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol with total suspended particulates in ambient air in municipal middle-school students in Korea. *Archives of Environmental Health*. 57(4):377–382. <https://doi.org/10.1080/00039890209601425>

Kiomarsipour N, Shoja Razavi R, Ghani K, Kioumarsipour M. 2013. Evaluation of shape and size effects on optical properties of ZnO pigment. *Applied Surface Science*. 270:33–38. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2012.11.167>

Nisbet I, LaGoy P. 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*. 16(3):290–300. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-x](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-x)

Zea Norma. 2005. Caracterización de las arcillas para la fabricación de ladrillos artesanales. [Guatemala]: Universidad de San Carlos Guatemala.

[OIT] Organización Internacional del Trabajo. 2001. Factores ambientales en el lugar de trabajo. [citado el 28 de diciembre de 2021] Disponible en: [https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed\\_protect/---protrav/---safework/documents/normativeinstrument/wcms\\_112584.pdf](https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_protect/---protrav/---safework/documents/normativeinstrument/wcms_112584.pdf)

[OIT] Organización Internacional del Trabajo. 2017. Trabajar juntos para promover un medio ambiente de trabajo seguro y saludable. [citado el 28 de noviembre de 2021]. Disponible en: [https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed\\_norm/---relconf/documents/meetingdocument/wcms\\_543632.pdf](https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_norm/---relconf/documents/meetingdocument/wcms_543632.pdf)

Ortiz Herrera L, Aguilar Estrada A, Ramos Cortés R. 2020. Characterization of the brick sector, Mexico: production, marketing, poverty and territory. *Textual*. 75:243–269. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5154/r.textual.2020.75.12>

Poursafa P, Moosazadeh M, Abedini E, Hajizadeh Y, Mansourian M, Pourzamani H, Amin M. 2017. A Systematic Review on the Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Cardiometabolic Impairment. *International Journal of Preventive Medicine*. 6(8):19. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_144\\_17](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_144_17)

Roa-Bohórquez K, Paredes-Roa R, Lara-González L, Peña-Rodríguez G. 2019. Aplicación de FeO, ZnO y CuO como pigmentos en compuestos cerámicos. *Informador Técnico*. 83(1):30–40. <https://doi.org/10.23850/22565035.1592>



Robinson M, Anthony T, Littau S, Herckes P, Nelson X, Poplin G, Burgess J. 2008. Occupational PAH exposures during prescribed pile burns. *Ann Occup Hyg.* 52(6):497-508. [https://doi: 10.1093/annhyg/men027](https://doi.org/10.1093/annhyg/men027)

Roszbach B, Preuss R, Letzel S, Drexler H, Angerer J. 2007. Biological monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by determination of monohydroxylated metabolites of phenanthrene and pyrene in urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health.* 81(2):221–229. <https://doi.org/10.1007/S00420-007-0209-9>

Rossella F, Campo L, Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Fustinoni S. 2009. Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers. *Occupational and Environmental Medicine.* 66(8):509–516. <https://doi.org/10.1136/oem.2008.042796>

Santos G, Vera Y. 2019. Estudio de la extracción de tierras raras ligeras a partir de la extracción líquido – líquido utilizando ácidos organofosforados y ácido ascórbico. *Revista de Metalurgia.* 55(2):e142. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.142>

Soto G, Sánchez L. 2017. Estudio comparativo de la resistencia a la compresión, absorción y dimensionamiento del ladrillo rafón producido en Quimistán, Chamelecón y Florida, Honduras. *Innovare: Revista de Ciencia y Tecnología.* 6(1):97–116.

Tsai P, Shieh H, Lee W, Chen H, Shih T. 2002. Urinary 1-Hydroxypyrene as a Biomarker of Internal Dose of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Carbon Black Workers. *The Annals of Occupational Hygiene.* 46(2):229–235. <https://doi.org/10.1093/ANNHYG/MEF017>

Unwin J, Cocker J, Scobbie E, Chambers H. 2006. An Assessment of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the UK. *Ann. Occup. Hyg.* 50(4):395–403. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mel010>

Vimercati L, Bisceglia L, Cavone D, Caputi A, De Maria L, Delfino M, Corrado V, Ferri G. 2020. Environmental Monitoring of PAHs Exposure, Biomarkers and Vital Status in Coke Oven Workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 17(7):2199. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072199>

## 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 de la sección de Acta Toxicológica Argentina en la página web de la Asociación Toxicológica Argentina (<https://toxicologia.org.ar/formulario->

acta/).

### **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 procesador de texto (Microsoft Word versión 2003 o superior), a doble espacio (incluso los resúmenes, referencias y tablas) con un tamaño

mínimo de letra Arial en 12 puntos. Las páginas deberán numerarse desde la portada. Las letras en negrita o itálica se usarán sólo cuando corresponda.

En la primera página se indicará: título del trabajo, apellido, nombre de autor 1; apellido, nombre de autor 2; apellido, nombre de autor 3; etc.; 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). En los manuscritos en español los números decimales deben indicarse con coma, y los miles con punto. En los manuscritos en inglés, los decimales deben indicarse con punto y los miles, con coma.

Las temperaturas se facilitarán en grados Cel-

sus 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  
Número  
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](http://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](http://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 posses 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 *Acta Toxicológica Argentina* section in the website of the Argentine Toxicological Association (<https://toxicologia.org.ar/formulario-acta/>).

### 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 Toxicológica Argentina* is totally free for authors, not having to pay any cost for its publication or for any of the previous stages.

### Copyright

Acta Toxicológica Argentina is an open access journal and has a Creative Commons Public License (CC-BY-NC). Authors retain copyright on their work; nevertheless, they guarantee the journal the right to be the first in its publication. Authors retain the rights of their work under the guidelines of the license CC BY-NC, Creative Commons Public License. They can freely share their work (always recognizing its initial publication in this journal) with the sole exception of its reproduction for commercial purposes, according to this kind of CC license.

### Publishing rights

Acta Toxicológica Argentina is an open access journal and has a Creative Commons Public License (CC-BY-NC). Authors retain the license of their article and the publication rights on their work; nevertheless, they guarantee the journal the right to be the first in its publication. Authors retain the license and rights to their work under the guidelines of the license CC BY-NC, Creative Commons Public License <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, surname, name author 1; surname, name author 2; surname, name author 3; etc. and affiliations of all authors, workplace (name of institution and postal address; if it differs between authors, numerical superscripts, not in parentheses, next to each author should be used to identify it); fax and/or e-mail address of the corresponding author (signaled by a subscript asterisk next to the name).

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submission and in English, each followed by 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. Decimals should be indicated by a point and thousands by a comma.

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...

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

### **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.

### **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](http://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](http://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>

## INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

---

**Acta Toxicológica Argentina** (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) é o órgão oficial de difusão científica da Associação Toxicológica Argentina. Integra desde o ano de 2007 o Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas, tem acesso a artigos e textos completos através da SciELO Argentina. *Acta Toxicológica Argentina* tem como objetivo a publicação de trabalhos relacionados com diferentes áreas da Toxicologia, em formato de artigos originais, relatos de casos, comunicações breves, atualizações ou revisões, artigos de divulgação, imagens, resumos da tese, notas técnicas, cartas ao editor e notícias.

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

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

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

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

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

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

**As imagens em Toxicologia** podem corresponder a imagens relacionadas à toxicologia, dos aspectos artísticos aos biológicos: plantas tóxicas, cogumelos tóxicos, animais venenosos, animais venenosos, animais venenosos, florações de algas, químicos, alterações ambientais, casos clínicos, diagnóstico por imagem (raios X, eletrocardiogramas, ecografias, angiografia, tomografia, ressonância magnética, microscopia óptica ou eletrônica, etc.).

O objetivo da Seção Imagens em Toxicologia é

a publicação de imagens originais (1-2 figuras de alta qualidade) ou clássicos interessantes ou descobertas incomuns que facilitem diagnóstico clínico, laboratorial ou eco-epidemiológico com origem toxicológica.

As imagens podem não ser excepcionais, mas sim ilustrativas.

O título deve ser curto e descritivo. Se a imagem é uma imagem clínica, o texto deve ser uma descrição da apresentação do paciente seguido de pontos explicativos relevantes e o diagnóstico final. As imagens devem incluir uma legenda descritiva. Se a imagem corresponde a outros pontos da toxicologia uma breve descrição do contexto deve ser incluída no texto. Favor usar setas ou sinais para identificar pontos de interesse na imagem. Nos casos clínicos, favor remover qualquer caso de identificação de pacientes.

O máximo de palavras recomendada é: resumo 200, texto 1000 e não mais de 12 referências. Será aceito um máximo de 3 autores por imagem.

Caso a imagem não seja original, ela deve ser acompanhada pela autorização do proprietário ou quem quer que seja o proprietário dos direitos, deve ser indicada na nota a ser submetida ao Editorial ao Conselho Editorial da *Acta Toxicológica*.

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

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

### Envio de trabalhos

Os manuscritos devem ser submetidos através do *Acta Toxicológica Argentina* en la página web de la Asociación Toxicológica Argentina (<https://toxicologia.org.ar/formulario-acta/>).

### **Gratuidade das publicações**

O envio, revisão, edição e publicação de qualquer tipo de material técnico científico ou de divulgação aceito pela *Acta Toxicológica Argentina* é completamente livre de custos para os autores, que não são obrigados a pagar nenhum tipo de custo de publicação ou para qualquer uma das etapas anteriores.

### **Direitos autorais**

Os autores retêm os direitos da publicação. *Acta Toxicológica Argentina* é um acesso aberto e detém uma Licença Pública Creative Commons (CC-BY-NC). Os autores conservam os direitos de publicação e garantia à revista o direito para ser o primeiro local de publicação do trabalho. Os autores retêm o direito ao seu trabalho sob o Regras da licença CC do tipo BY-NC "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licença Pública Creative Commons que permite compartilhar o trabalho, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista, os autores podem dispor da obra para qualquer finalidade que considerem adequada, com a única exceção de sua reprodução para fins comerciais, de acordo com este tipo de licença CC.

### **Direitos de publicação**

Os autores conservam os direitos de publicação. *Acta Toxicológica Argentina* é um acesso aberto

publicação de livre acesso e detém um Licença Pública Creative Commons (CCBY-NC). Os autores retêm os direitos de publicação direitos de publicação e conceder à revista o direito de ser a primeira ser o primeiro site de publicação da obra. Os autores retêm o direito de publicar seu trabalho de acordo com as regras do a licença CC BY-NC, "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licença Pública Creative Commons que permite que o trabalho seja compartilhado, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista, com os autores os autores podem utilizar a obra para qualquer finalidade a única exceção de sua reprodução para fins comerciais de acordo com este tipo de licença CC.

### **Aspectos gerais na preparação do manuscrito para artigo original**

Os manuscritos devem ser escritos usando um processador de texto (Microsoft Word versão 2003 ou superior), espaçamento duplo (incluindo resumos, referências e tabelas) fonte Arial e tamanho mínimo 12. As páginas devem ser numeradas a partir da página de título. Negri-

to ou itálico ou itálico deve ser usado somente quando apropriado.

Na primeira página deve ser indicado: título do artigo, nomes e sobrenome (sobrenome Autor 1, nome; sobrenome Autor 2, nome; sobrenome Autor 3, nome; etc. etc.) de todos os autores, local de trabalho (nome da instituição e endereço postal); se houver autores com diferentes locais de trabalho, os sobrescritos numéricos devem ser utilizados- não colocar entre parênteses - ao lado dos nomes, de modo a identificar cada autor com seu respectivo local de trabalho; fax e/ou e-mail do autor responsável pela correspondência (a ser indicada com um asterisco em sobrescrito ao lado do nome). A segunda página deve incluir o título em inglês e o resumo no idioma do artigo e em inglês, cada uma seguida por uma lista de três a seis palavras-chave m no idioma correspondente. Se o artigo for escrito em inglês, deve ter um resumo em espanhol. As palavras-chave devem começar com uma letra maiúscula e separados por ponto-e-vírgula.

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

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

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

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

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

As **tabelas** deverão ser apresentadas em fo-



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

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

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

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

O título das figuras deverá ser apresentado exclusivamente em folha à parte, ordenadas e numeradas, e deverão expressar especificamente o que mostra a figura.

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

**Unidades de medida.** As medidas de longitude, tamanho, peso e volume deverão ser expressas em unidades métricas (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serão expressas em graus Celsius e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apre-

sentados em unidades do sistema métrico decimal, de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderão solicitar que, antes de publicar o artigo, os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

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

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

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

## Bibliografia

### Parte 1: citações no texto

O nome do autor e ano de publicação aparecem entre parênteses no final da frase:

Esta afirmação foi posteriormente refutada (Jones 2008).

Se o nome do autor for claramente mencionado no texto, pode ser seguido diretamente pelo ano de publicação entre parênteses:

Jones (2008) posteriormente refutou essa afirmação.

Se o nome do autor e o ano forem claramente mencionados no texto, não é necessário incluir uma referência entre parênteses:

Em 2008, Jones refutou essa afirmação.

Se você está citando uma parte específica de um documento (por exemplo, uma citação direta ou uma figura, gráfico ou tabela), inclua o número da página onde essas informações podem ser encontradas:

"Esses resultados contradizem claramente o publicado

em 2004 pelo laboratório Smith". (Jones 2008, p. 56).

### Mais de um autor

Se um documento tiver dois autores, inclua ambos os sobrenomes separados por "e". Para trabalhos

com três ou mais autores, inclua apenas o nome do primeiro autor, seguido de "et al.":

... (Andrews e Gray 1995).

... (Gómez *et al.* 2003).

### Múltiplas obras de diferentes autores.

Se citar várias fontes ao mesmo tempo, liste-as em ordem cronológica, se foram publicados duas ou mais obras no mesmo ano liste-as em ordem alfabética, e separe cada uma por ponto e vírgula:

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

### Vários trabalhos publicados pelo mesmo autor no mesmo ano.

Se você está citando duas ou mais obras escritas pelo mesmo autor no mesmo ano, adicione um identificador (a, b, c ...) para distingui-los. Use os mesmos identificadores na lista de referência:

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

Dubois J. 1976a. Detecção de tendência dentro...

Dubois J. 1976b. Padrões de distribuição de ...

### Citando uma fonte secundária ou indireta

Se deseja citar uma fonte que já é citada em outro documento, é sempre melhor consultar e fazer a citação da fonte original. No entanto, se não conseguir localizar e verificar o documento original, você deve citar a fonte secundária e ao mesmo tempo reconhecer o autor da ideia original tanto na citação no texto quanto na referência final:

... (Rawls 1971, citado em Brown 2008)

Rawls J. 1971. A Theory of Justice. Cambridge (MA): Belknap Press. Citado em: Brown PG. 2008. The Commonwealth of Life: Economics para uma Terra florescente. 2ª ed. Montreal (QC): Black Rose Books.

### Organizações como autores

Se o autor de um documento for uma organiza-

ção, corporação, departamento governamental, universidade etc., use uma forma abreviada da organização na citação no texto, mantendo a primeira letra de cada palavra do nome, ou alguma outra abreviatura reconhecida:

... (FAO 2006).

### Parte 2: lista de referências

A lista de referências está no final de seu trabalho e inclui informações bibliográficas completas de todas as fontes citadas no texto. As referências são listadas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor.

### Componentes de referências na lista de referências.

Os seguintes componentes, se disponíveis, são incluídos ao citar uma fonte, na seguinte sequência:

#### Livros e outras monografias.

Autor (es) ou Editor (es)

Ano de publicação

Título

Conteúdo ou designador médio

Edição

Autor (es) Secundário (s)

Local de publicação

Editor

Paginação

Série

#### Artigos de revistas e periódicos/jornais.

Autor (es)

Ano de publicação

Título do artigo

Conteúdo ou designador médio

Título de revista ou jornal

Volume

Número

Paginação

#### Autor (es) ou Editor (es)

Liste os sobrenomes e iniciais dos autores na ordem em que aparecem no documento original, e separe cada um com uma vírgula.

Mary-Beth Macdonald e Laurence G. Kaufman se convertem em Macdonald MB, Kaufman LG.

Se o documento tiver editores em vez de autores, coloque os sobrenomes e as iniciais seguidas de uma vírgula e "editor (es)":

Macdonald MB, Kaufman LG, editores.

### **Mais de dez autores.**

Sempre inclua os nomes dos dez primeiros autores. Se houver mais de dez, inclua apenas os primeiros dez nomes de autores, seguidos de uma vírgula e "et al".

### **Autor (es) Secundário (s)**

Os autores secundários incluem tradutores, ilustradores, editores ou produtores, e podem ser incluídos na referência, além dos autores principais, após o título do livro:

Marquez GG. 1988. Amor em tempos de cólera. Grossman E, tradutor. Nova York...

### **Organizações como autores**

O nome completo da organização deve ser identificado na lista de referências, mas precedido pela abreviatura usada no texto, entre colchetes. Ordene a referência em ordem alfabética pelo nome completo, não por acrônimo:

[FAO] Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura. 2006. Gênero e direito: direitos das mulheres na agricultura ...

### **Título**

Inclui o título como os subtítulos, mantendo a pontuação usada no documento original. Para livros e títulos de artigos de revistas, escreva em maiúsculo somente a primeira palavra, bem como nomes próprios, siglas e iniciais. Todas as palavras importantes nos títulos das revistas podem ser escritas em letras maiúsculas:

Livro: Cultura de células vegetais: métodos essenciais  
Revista: Canadian Journal of Animal Science

### **Designador de conteúdo**

Os designadores de conteúdo descrevem o formato de um documento e podem ser usados para fornecer informações adicionais em relação à natureza de um documento (por exemplo, dissertações, teses, bibliografias e certos tipos de artigos de revistas, como editoriais, cartas ao editor, notícias etc.) Os designadores de conteúdo aparecem entre colchetes logo após o título:

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

### **Designador médio**

Os designadores médios indicam que o documento está em um formato não impresso, como "DISQUETES", "CD-ROM" ou "Internet". É requerido designadores médios e aparecem entre colchetes logo após o título:

Gooderham CB. 1917. Doenças das abelhas [DISQUETES]. Ottawa ...

### **Local de publicação e editorial**

O local de publicação refere-se à cidade onde o editor está localizado. Esta informação é normalmente encontrada na capa do livro em questão, ou no registro do catálogo McGill. Se não encontrar o lugar de publicação, use as palavras [lugar desconhecido] entre colchetes. Se aparecer mais de uma cidade, use apenas a primeira que aparecer. Certas cidades podem estar sozinhas (por exemplo, Nova York), mas para evitar confusão, se pode escrever o nome do país ou incluir o Código ISO de 2 letras do país (por exemplo, Reino Unido: GB). Para cidades canadenses ou estadunidenses, se pode incluir o código do estado ou província de duas letras.

### **Paginação**

Se você usar apenas parte de um trabalho publicado (isto é, um artigo de revista ou um capítulo de livro), indique a paginação da seção que se refere. A paginação é opcional se fizer referência a todo o trabalho.

### **Série**

Se o documento fizer parte de uma série, deve se adicionar o título da série e o número do volume no final da entrada.

### **Parte 3: exemplos (impresso) Artigo de revista**

Autor (es). Ano. Título do artigo. Nome da revista. Volume (edição): 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.

### **Livro**

Autor (es). Ano. Título do livro. Edição. Lugar de publicação: Editora.

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

### **Capítulo em um livro**

Autor (es). Ano. Título do capítulo. In: Título de livro. Edição. Local de publicação: Editora. pags. Páginas do capítulo.

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

### **Livro editado**

Nome (s) do editor, editores. Ano. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editora.

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

### **Capítulo ou artigo em um livro editado**

Autor (es). da parte. Ano. Título do capítulo. In: Nome (s) do editor, editores. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editorial. pags. Páginas do 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.

### **Artigo em um dicionário ou enciclopédia.**

Cite como faria com um artigo em um livro editado; Se o autor da parte não for especificado, o editor assume o lugar do autor.

### **Livro de série**

Autor (es). Ano. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editorial. (Título da série; vol. #)

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

### **Tese ou Dissertação**

Autor (es). Ano. Título [designador de conteúdo]. [Local de publicação]: Editor (frequentemente uma universidade).

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

### **Documentos de conferência ou atas**

Autor (es). Ano. Título do trabalho. Em: nome (s) do (s) editor (es), editores. Título do volume. Número e nome da conferência; data da conferência; Local da conferência. Local de publicação: Editorial. p. 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: exemplos (eletrônico)**

A proliferação de informações eletrônicas introduziu novos desafios, como os documentos que podem existir em vários formatos diferentes. Fontes eletrônicas são citadas da mesma forma que suas homólogas impressas, com alguns elementos específicos da Internet agregados: um designador médio (ver descrição anterior), a data do documento foi modificada ou atualizada pela última vez (se está disponível), a data citada e a URL do documento ou o DOI (identificador de objeto digital).

As opiniões divergem sobre a melhor maneira de citar artigos de periódicos eletrônicos. Geralmente, um artigo eletrônico baseado em uma fonte impressa, em formato PDF, é considerada inalterável e citado como um artigo impresso.

### **Artigo eletrônico em formato PDF.**

Artigos em formato pdf, baseados em uma fonte impressa, podem ser citados como artigos de revista impressa (exemplo na Parte 3).

**Artigo eletrônico em formato HTML ou texto.**

Autor (es) Ano. Título do artigo. Nome da revista [designador médio]. [data atualizada; Data da citação]; Volume (edição): páginas (se estiverem disponíveis). Disponível em: URL ou DOI

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

**Livro eletrônico**

Autor (es) ou Editor (es). Ano. Título do livro [designador médio]. Edição. Local de publicação:

editorial; [data atualizada; data da citação]. Disponível em: 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]. Disponível em: [www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283](http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283)

**Artigo em um dicionário eletrônico ou enciclopédia.**

Cite como faria com um artigo de livro Eletrônico

Allaby M, editor. 2006. photosynthesis. In: *Dictionary of Plant Sciences* [Internet]. Rev. ed. Oxford: Oxford University Press; [citado em 31 de agosto de 2010]. Disponível em: [www.oxfordreference.com/entries/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147](http://www.oxfordreference.com/entries/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147)

**Site web**

Título do site [designador médio]. Data de publicação. Local de publicação: Editorial; [data atualizada; Data da citação]. Disponível em: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [atualizado al 30 de março de 2007; citado em 11 de janeiro de 2013]. Disponível em: <http://www.is.mcgill.ca/upo/factbook/index-upo.htm>

**Documento online**

Autor (es). Data de publicação. Título [designador médio]. Edição. Local de publicação: Editorial; [data atualizada; Data da citação]. Disponível em: URL

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