



**FUNDACION NEXUS**

**CIENCIAS SOCIALES – MEDIO AMBIENTE – SALUD**

***ECOTOXICOLOGIA DE METALES***  
***Aspectos teóricos, problemas metodológicos y***  
***aspectos prácticos***

Buenos Aires, noviembre/2010

Av. SANTA FE 1845 7° "D" (1123) BUENOS AIRES - TEL/FAX 5-217-2780/81  
[www.nexus.org.ar](http://www.nexus.org.ar) E-mail [fundacion@nexus.org.ar](mailto:fundacion@nexus.org.ar)

## 1- INTRODUCCION

-----

Los metales, cuya presencia en el ambiente se debe tanto a fuentes antrópicas como naturales, pueden ser una amenaza para la integridad de las comunidades acuáticas. Si bien existen normas que fijan los límites máximos de descarga permitidos en los efluentes para distintos tipos de ambientes acuáticos, éstas suelen basarse en un conocimiento incompleto de los mecanismos por los cuales estos compuestos son tóxicos. La consecuencia directa es que muchas de estas normas pueden ser tanto sobreprotectoras como subprotectoras para el ecosistema. Una norma sobreprotectora traerá aparejados sobrecostos en los procesos de depuración de efluentes que, al no estar sólidamente fundamentados, no todos los industriales estarán dispuestos a pagar. Por otro lado, el riesgo de generar daños irreversibles en el ecosistema debidos a una norma subprotectora también trae aparejados grandes costos (que se manifestarán bajo la forma de una menor calidad de vida y en consecuencia serán pagados por todos por períodos de tiempo más largos). El desarrollo de tecnologías que disminuyan la cantidad de metales en los efluentes es una estrategia que permite moderar el impacto originado por la liberación de tóxicos a un cuerpo de agua. Por otra parte, para paliar el déficit de conocimientos básicos, se está desarrollando una intensa actividad de investigación cuyo objetivo central es llegar a comprender mejor el comportamiento físico, químico y biológico de los sistemas acuáticos, presuponiendo que esta información ayudará a acotar mejor los límites máximos de descarga permitidos.

No existe aún una metodología satisfactoria que permita estimar el riesgo real que ofrecen los metales a la vida acuática. Los parámetros que hay que evaluar son complejos y actualmente falta información sobre muchos de ellos. Una metodología adecuada para encarar estos problemas debería tener en cuenta tanto las características de las especies presentes en el ecosistema como parámetros físicoquímicos locales. Entre las variables a considerar se puede mencionar la dinámica propia del ecosistema, las distintas formas que puede adoptar cada contaminante en ese medio, la biodisponibilidad de cada una de esas formas, las sensibilidades diferenciales de los distintos organismos a cada tóxico, los mecanismos a través de los cuales actúan en cada especie y el efecto de la exposición a múltiples contaminantes en concentraciones subtóxicas usuales en los cuerpos de agua.

## 2- ASPECTOS TEORICOS

-----

### 2.1-TOXICIDAD DE LOS METALES

La toxicidad de un metal depende de variables físicoquímicas tales como la valencia con la que está presente, que esté como iones simples o complejados, que los complejos que forme sean liposolubles, fuertes o débiles, que se adsorba o no sobre partículas, que adopte una forma particulada, etc. Depende

también de qué otras sustancias están presentes y de sus concentraciones. Estas múltiples posibilidades hacen que conocer la concentración del metal sea información necesaria pero no suficiente como para evaluar su toxicidad. Como ejemplo de la alteración de la toxicidad de un metal debido a la presencia de otros iones en solución se puede mencionar la menor toxicidad en aguas con altos niveles de calcio, con carbono orgánico disuelto y en medios relativamente ácidos (aunque la acidez misma es tóxica). A estas variables hay que agregarle el hecho de que la sensibilidad de las distintas especies o de los distintos estadios de desarrollo de una misma especie a cada tóxico puede diferir significativamente.

No solo los metales conocidos como pesados son tóxicos. Los metales esenciales (es decir, aquellos que el organismo necesita para sus procesos metabólicos) también pueden llegar a serlo. La curva de crecimiento de un organismo en función de la concentración de un metal esencial presenta dos zonas de inhibición de crecimiento: a concentraciones bajas por deficiencia y a concentraciones altas por intoxicación; con los metales no esenciales las curvas mostrarán solamente inhibición a concentraciones altas.

## **2.2-BIODISPONIBILIDAD**

Los mecanismos de toxicidad dependen del metal, de su concentración, de la especie sobre la que actúa, de la vía de entrada al organismo y del tiempo de exposición. La importancia de la vía de entrada al organismo es muy clara en los mejillones, que son muy usados como indicadores de contaminación en ambientes costeros. Hay dos vías de exposición preferenciales: los metales disueltos en el agua y los presentes en el fitoplancton del cual se alimentan. Se ha comprobado que los metales disueltos se acumulan predominantemente en las caparazones mientras que los ingeridos con el fitoplankton se acumulan predominantemente en los tejidos blandos.

Para que haya intoxicación deben ser posibles interacciones físicoquímicas a nivel molecular entre el metal y una vía biológica (transporte activo, proceso metabólico, etc.). Variables tales como tamaño, carga total, carga superficial y forma condicionan la posibilidad de que se de esta interacción pudiendo atribuirse a estas causas las toxicidades diferenciales observadas en muchos casos para las distintas formas en las que pueda encontrarse el metal (libre, complejado, adsorbido en la fracción particulada, etc.).

Los microorganismos pueden captar metales a través de mecanismos activos (que por ir en contra de un gradiente necesitan energía) o pasivos. En el caso particular de las levaduras, las propiedades físicas del metal, la fisiología celular y condiciones ambientales tales como temperatura y pH modulan la acumulación de metales. En estos microorganismos la bioacumulación de metales es mayor cuando previamente a la exposición a metales se las incubaba con glucosa indicando que la captación de metales ocurre por un proceso activo ( esta propiedad de está estudiando como alternativa en procesos de bioremediación).

Estas variables (vía de entrada, forma en la que se encuentra el metal, tiempos de exposición y estado metabólico) condicionan la posibilidad de que el tóxico ingrese al organismo e interactúe con algún proceso bioquímico, es decir su biodisponibilidad.

## **2.3-MODELOS PARA PREDECIR LA BIODISPONIBILIDAD DE METALES**

### **2.3.1-MODELOS TERMODINAMICOS**

De acuerdo con algunos modelos, un ecosistema acuático consta de tres compartimentos (organismos vivos, agua y sedimentos) en los que las distintas fracciones disueltas y particuladas del metal (cationes solubles libres, complejados, ligados a las distintas fracciones particuladas, unidos al sedimento y ligados a sistemas vivos) están en equilibrio dinámico. Según este modelo, al existir este equilibrio todas las formas presentes son potencialmente biodisponibles: un cambio en la concentración de cualquiera de las formas presentes forzaría a una redistribución en todas las demás. Esta redistribución puede ser predicha si se conocen las constantes termodinámicas de afinidad que describen al sistema siendo posible, en principio, estimar la toxicidad real a partir de parámetros termodinámicos. La eficacia predictiva de estos modelos depende de la calidad de los datos tabulados. Su principal limitación radica en el riesgo que implica extrapolar resultados obtenidos a situaciones para las cuales las constantes termodinámicas no hayan sido medidas.

### **2.3.2-"MODELO DE LAS BRANQUIAS" ("binding")**

Los mecanismos de toxicidad aguda (exposiciones a concentraciones relativamente altas de tóxicos por tiempos relativamente cortos) son distintos a los de toxicidad crónica (exposición a concentraciones menores de tóxico pero por períodos de tiempo más prolongados). En el caso particular de los peces se sabe que las branquias son el principal sitio de acción de los tóxicos en situaciones agudas mientras que en los casos crónicos hay una correlación entre bioacumulación y daño interno que aún no está bien comprendida.

En los peces, Las branquias cumplen dos funciones críticas: participan en el intercambio gaseoso ( $O_2$ ,  $CO_2$  y  $NH_3$ ) y en el transporte activo de iones ( $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$ ) necesario para contrarrestar la pérdida pasiva (por gradiente electroquímico) de iones hacia el agua. Se sabe que metales como cobre, zinc, cadmio, plata y aluminio actúan como tóxicos "de superficie", ligándose a sitios aniónicos de las branquias que parecen cumplir una función importante en los procesos de transporte. El cobre, la plata y el aluminio bloquean el transporte de sodio y el cadmio y el zinc bloquean el transporte de calcio produciendo hiponatremia e hipocalcemia respectivamente. El aluminio además de inhibir la captación de sodio tiene un segundo efecto tóxico : hace hinchar las branquias. La liberación de amoníaco y dióxido de carbono en las branquias produce cambios de pH en el microentorno que estarían relacionados con los mecanismos de toxicidad debida a metales tales como el aluminio, cuya solubilidad es fuertemente dependiente del pH. En los peces intoxicados con aluminio se postula que ocurre en las branquias una precipitación del metal debida a la

alcalinización del agua producida por la liberación de amoníaco como consecuencia de procesos metabólicos.

En los últimos años se han cuantificado y diferenciado los sitios de unión de metales a las branquias y se han medido constantes aparentes de afinidad. Estos avances han permitido desarrollar un modelo de toxicidad en peces que postula que la especie activa es el metal libre (no complejado) que se uniría a través de reacciones químicas rápidas a sitios de unión de la branquia negativamente cargadas. Por estos sitios competirían cationes metálicos, protones y cationes fisiológicamente importantes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$ .

La concentración de iones metálicos libres en el agua se reduce por la formación de complejos con materia orgánica disuelta, bicarbonato, cloruros, ligandos sintéticos, etc. Estos agentes complejantes se unirán al metal con constantes de afinidad que pueden ser medidas. Se puede predecir la toxicidad de un metal comparando las afinidades con los complejantes presentes en el medio y las branquias. Si las primeras son mayores que la segunda, el metal no será tóxico y lo será si la relación es la inversa.

Se puede estimar la constante de afinidad branquias-metal midiendo la captación de metal por las branqueas de un pez que fue expuesto a medios conteniendo el metal complejado con sustancias cuya afinidad se conoce. Si la afinidad por el complejante es mayor que por la branquia ésta no acumulará metal y lo hará si es menor. Se ha encontrado que la afinidad de distintos metales con las branquias correlaciona con su afinidad hacia el EDTA. Se postula que las excepciones darían información adicional sobre distintos mecanismos fisiológicos  $\dot{}$ . Con la misma metodología se pueden evaluar los efectos protectores de los compuestos presentes en el agua sobre la toxicidad de metales.

Si los metales se unen a sitios específicos de una forma predecible, se puede calcular la toxicidad usando un sistema de ecuaciones que tengan en cuenta las constantes de afinidad y la competencia entre distintos sitios en la columna de agua. Ya han sido desarrollados programas de cálculo para procesos geoquímicos que tienen en cuenta interacciones de este tipo. Su uso en el campo de la ecotoxicología es promisorio.

En la capacidad de este modelo para predecir la toxicidad de un metal en base a constantes de afinidad medidas es lo que lo hace interesante. Por ahora ha sido comprobado en branquias de peces. Se están llevando a cabo estudios que intentan extenderlo a otra especie (vegetales y animales) y a otras condiciones (contaminantes en sedimentos y agua).

Si los efectos tóxicos de un metal se deben a su unión a sitios de transporte específicos en la superficie receptora del organismo sería posible desarrollar una nueva herramienta para evaluar la calidad toxicológica de un agua. La comparación entre las constantes de afinidad de los metales para distintos ligandos con la de las branquias permitiría predecir si un metal estará biodisponible o no en un efluente de composición conocida. La estimación del grado de saturación de los sitios de las branquias por el metal serían

buenos predictores de mortalidad o supervivencia. Es posible así explicar los efectos debidos a la composición del agua sobre la toxicidad de metales.

Si bien este modelo promete ser una herramienta muy útil y se está estudiando su validez con otras especies, todavía tiene limitaciones que deben ser consideradas. Una de las críticas que ha recibido que no es extrapolable a situaciones extremas (pH muy altos o muy bajos, concentraciones de metales o de materia orgánica disuelta muy altas).

## **2.4-METALES PESADOS Y CARBONO ORGANICO DISUELTO**

La concentración de metales pesados en el agua depende fuertemente del suelo. Hay una partición entre la fase sólida y la acuosa que ocurre a través de distintos mecanismos (incluyendo disolución, precipitación, complejamiento y fijación biológica). El mayor efecto del complejamiento es aumentar considerablemente la concentración de los metales totales disueltos. Es interesante notar que si bien esta característica puede ser perjudicial para el medio ambiente (por la posibilidad de que el metal complejado solubilizado pueda ser transportado a largas distancias antes de precipitar), es una propiedad que se puede aprovechar para recuperar suelos contaminados.

El complejante natural más importante en un medio acuático es el carbono orgánico disuelto (o sustancias húmicas) que incluye a los ácidos húmicos, fúlvicos y las huminas). Estos compuestos estables se originan en la descomposición de tejidos vegetales y animales. Como la información que se tiene sobre su estructura química es aún insuficiente, se los define a través de lo que no son: son aquellas sustancias que no pueden ser incluidas en otras clases de compuestos (tales como polisacáridos, proteínas, etc). Se los clasifica por la forma en que se los separa: son ácidos húmicos aquellos que son insolubles a pH menor que 2 y solubles a pH mayores, ácidos fúlvicos los solubles en agua a todo pH y las huminas constituyen la fracción insoluble.

El contenido de ácidos húmicos en suelos oscila entre 0 y 10 % . Su concentración en aguas (que se expresa como carbono orgánico disuelto) varía entre 0,1 y 50 ppm en pantanos de aguas negras y entre 0,5 y 1,2 ppm en aguas oceánicas superficiales. Alrededor del 10 % del carbono orgánico disuelto de aguas superficiales está como materia suspendida (recubriendo partículas inorgánicas).

Las sustancias húmicas juegan un rol fundamental en la dinámica de los metales al ser capaces de transportarlos largas distancias antes de inmovilizarlos por precipitación (la ocurrencia de un proceso u otro está determinado por las condiciones ambientales). Los sedimentos ricos en sustancias húmicas también están enriquecidos en metales pesados; la concentración de metales pesados en aguas correlaciona con la de carbono orgánico disuelto. En presencia de sustancias húmicas, la forma predominante en la que se encontrarían los metales sería complejo modificando su biodisponibilidad (en la mayoría de los metales pesados estudiados la asociación con sustancias húmicas reduce su captación por la biota).

### **3-PROBLEMAS METODOLOGICOS**

-----

#### **3.1-ENSAYOS QUIMICOS Y ECOLOGICOS**

Los ensayos químicos, que dan información sobre qué y cuánto hay de cada metal, pueden ser complementados con análisis ecológicos que estudian los efectos de los mismos contaminantes sobre la vida silvestre. Si bien la complementación entre ambas metodologías permite diseñar estrategias para la recuperación de un ecosistema, esta aproximación tiene el serio inconveniente de que, aún teniendo la información química y ecológica completa suele ser difícil (y a veces imposible) establecer una relación causa-efecto entre los parámetros medidos: en un sistema sometido a múltiples contaminantes esta aproximación no permite identificar cuál o cuáles de ellos causa el daño. Tampoco son útiles para evaluar los efectos debidos a exposiciones crónicas a dosis subtóxicas de mezclas de contaminantes.

#### **3.2-ENSAYOS TOXICOLOGICOS**

Los ensayos de toxicidad permiten evaluar el daño que un contaminante produce en una especie dada. Los ensayos consisten en exponer organismos a concentraciones crecientes del contaminante durante períodos de tiempo prefijados. Dependiendo del ensayo seleccionado se puede medir mortalidad, malformaciones, dosis efectivas, genotoxicidad, crecimiento, neurotoxicidad, etc. Los resultados pueden expresarse como valores absolutos, porcentajes o datos estadísticos (como la concentración letal 50 que es la concentración que mata al 50 % de los organismos), valores que expresen límites de riesgo (como la mayor concentración que no produce daño evidente o la menor concentración que mata a todos los organismos presentes), etc. Los ensayos pueden diseñarse para medir efectos agudos o crónicos. Si bien son un avance sobre los análisis químicos al permitir evaluar otras variables además de la concentración del tóxico no necesariamente los resultados obtenidos en las condiciones controladas del laboratorio son extrapolables a un ecosistema completo.

En algunos ensayos de toxicidad aguda se trabaja con microorganismos que en condiciones normales emiten luz, siendo la inhibición en la emisión luminosa el parámetro que correlaciona con la toxicidad. Son ensayos relativamente sencillos, rápidos, fáciles de reproducir, económicos y, al permitir trabajar con grandes poblaciones, son potencialmente más reproducibles. Sin embargo no siempre las concentraciones letales 50 obtenidas reflejan la toxicidad real.

Hay una amplia gama de ensayos de toxicidad que utilizan otras especies (desde embriones de erizos hasta peces). Uno de los organismos más utilizados es la larva de la pulga de agua *Daphnia magna* (se mide la inhibición en la motilidad en función de la concentración del contaminante). Si bien es un ensayo ampliamente difundido los resultados obtenidos sólo sirven a modo orientativo porque ni las condiciones de laboratorio explicitadas en el ensayo

reproducen las de los ecosistemas naturales ni la sensibilidad de *Dafnia* es igual a la de las demás especies.

Actualmente se están desarrollando muchos trabajos de investigación en los que se trabaja con embriones de sapos y ranas cuya sensibilidad a los contaminantes varía en los distintos estadios de desarrollo. El hecho de ser organismos muy sensibles a los tóxicos podría permitir usarlos como indicadores tempranos de toxicidad.

### **3.3-BIOENSAYOS**

Se están desarrollando ensayos más complejos que tienen en cuenta características particulares de cada ecosistema (organismos representativos, parámetros físicoquímicos y geológicos específicos, etc.). En su diseño se tienen en cuenta tanto la biodisponibilidad real como las posibles interacciones entre contaminantes. Algunos de estos ensayos desarrollados a escala de laboratorio son relativamente poco costosos y rápidos. En algunos países los bioensayos han sido incorporados a los ensayos estandarizados recomendados para evaluar la calidad de aguas y efluentes. En la Argentina, si bien están considerados en la ley de residuos peligrosos, aún no se han hecho los trabajos de desarrollo que permitirían adaptarlos a las características de los ecosistemas locales.

## **4- ASPECTOS PRACTICOS**

-----

### **4.1- PROBLEMAS AL FIJAR LIMITES DE DESCARGA**

Las primeras normas que regulaban las concentraciones de metales pesados permitidos en efluentes fijaron sus límites en base al metal total recuperable que se determina en muestras digeridas con ácidos. Se incluyen acá tanto las formas solubles (definidas operativamente como aquellas que quedan en solución luego de hacer pasar el agua a través de una membrana de poros de 0,40-0,45 micrones de diámetro) como la fracción particulada. El presupuesto subyacente al fijar estas normas es que todas las formas del metal presente son igualmente biodisponibles y/o tóxicas. La información disponible actualmente clasifica a los metales libres como las formas más tóxicas. Sobre este presupuesto, se tiende a fijar los límites en base a la fracción soluble (que incluye metal disuelto no complejoado, complejoado y combinado en partículas suficientemente pequeñas como para atravesar los poros de la membrana).

Como ya se mencionó, los ensayos de toxicidad se hacen en condiciones controladas de laboratorio con especies estandarizadas y usando aguas "sintéticas" (fabricadas en el laboratorio a partir de sales puras y agua destilada) como agua de dilución. En estos ensayos no se tiene en cuenta el efecto debido a los solutos presentes en el agua local. Una forma de evaluar este efecto es hacer dos ensayos paralelos: en uno se hacen las diluciones con aguas "sintéticas" de laboratorio y en otro con aguas locales.



## 4.2- UN CASO REAL

Un ejemplo de lo complejo que resulta establecer relaciones causa-efecto entre ensayos químicos y toxicológicos y de las dificultades metodológicas que surgen cuando se quiere comparar resultados obtenidos con distintos ensayos toxicológicos es la evaluación de riesgo toxicológico en la bahía de Tampa (Florida, EEUU) hecha por Carr y col. Trabajaron con 165 muestras tomadas en sitios muy dispares seleccionados en función de las actividades industriales desarrolladas en las distintas áreas en las que se dividió la zona. Midieron la concentración de más de 60 compuestos orgánicos e inorgánicos (metales, pesticidas, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, carbono, sulfuros, amonio, carbonatos y la granulometría del sedimento) y realizaron tres ensayos de toxicidad diferentes (supervivencia en 10 días del anfípodo *Ampelisca abdita* en sedimentos completos, inhibición de la fertilización en erizo de mar (*Arbacia punctulata*) por el agua retenida en los sedimentos e inhibición sobre la bioluminiscencia de los compuestos extractables con solventes de los sedimentos). El 63 % de las muestras resultaron ser significativamente tóxicas para la fertilización del erizo de mar por el agua retenida en los sedimentos pero solamente 3 % de los sedimentos resultaron tóxicos para los anfípodos. Las dificultades en interpretar estos datos se agravan por el hecho de que estos últimos resultados no pudieron ser reproducidos cuando usaron otra partida de animales de laboratorio. Alrededor del 18 % de los compuestos extractables de los sedimentos resultaron tóxicos para los microorganismos bioluminiscentes. Si bien las muestras que resultaron ser más tóxicas frecuentemente contenían altas concentraciones de contaminantes, no les fue posible identificar el o los compuestos responsables de la toxicidad ni predecir la toxicidad observada a partir de las concentraciones medidas de contaminantes. Pese a sus limitaciones, estos ensayos permiten seleccionar entre todos los compuestos presentes cuáles son los que tienen mayor probabilidad de ser la causa de los efectos tóxicos.

## 5-BIBLIOGRAFIA

-----  
Carr, R.S., Long, E.R., Windom, H.L., Chapman, D.C., Thursby, G., Sloane, G.M. y Wolfe, D.A. "Sediment Quality Assessment Studies of Tampa Bay, Florida". *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol 15 No. 17 pp.1218-1231 (1996)

Fisher, N.S., Teyssie, J.L., Fowler, S.W. y Wang, W. "Accumulation and Retention of Metals inMussels from Food and Water: a Comparison under Field and Laboratory Conditions" en *Environ.Sci.Technol.* vol 30 pages 3232-3242 (1996)

Gaffney, J.S., Marley, N.A. y Clarck, S.B. " Humic and Fluvic Acids and Organic Coloidal Materials in the Environment" cap. pages 2 a 16 en "Humic and Fulvic Acids, Isolation, Structure and Environmental Role" Editado por Gaffney, J.S., Marley, N.A. y Clarck, S.B. ACS Symposium series 651 (1996)

Herkovits, J. Herkovits, F.D. y Pérez Coll, C. "Identification of Aluminum Toxicity and Aluminum-Zinc Interaction in Amphibian Bufo arenarum Embryos" Environm. Sci. vol 5 No. 1 pags 57 a 64 (1997)

Pendergast, J.F. (chair). "Regulatory practice for metals" cap.3 pags. 13 a 29 en "Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection" editado por H.L.Bergman y E.J. Setac Press (1996)

Peters, R.W. y Shem,L. "Use of Chelating Agents for Remediation of Heavy Metal Contaminated Soil" cap.6 pags.71 a 84 en "Environmental Remediation-Removing Organic and Metal Ion Pollutants" editado por Vandergrift, G.F., Reed, D.T. y Tasker, I.R. ACS Symposium Series 509 (1992)

Porta, A. "Contaminación Ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico" Acta Bioq.Clin. Latinoamer. Vol XXX No. 1 pags. 67-79 (1996)

Sherrard, K.B., Marriott, P.J., McCormick, M.J. y Millington, K. "A Limitation of the Microtox Test for Toxicity Measurements of Nonionic Surfactants" Envir.Toxicol, Chem. col 15 No. 7 pags 1034 a 1037 (1996)

Stoll, A. y Duncan, J.R. "Enhanced Heavy Metal Removal from Waste Water by Viable Fluucose Pretreated Saccharomyces cerevisiae Cells" en Biotechnology Letters vol.18 No. 10 pags 1209 a 1212 (1996)

Sutter, G.W. "Toxicological Benchmarks for Screening Contaminants of Potential Concern for Effects on Freshwater Biota" en Environ.Toxicol.Chem. vol 15 No.1 pags 1232 a 1241 (1996)

Wood, C. M. (chair) Environmental Toxicology of Metals. Cap. 4 pags 31 a 56 en "Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection" editado por H.L.Bergman y E.J. Setac Press (1996)