

Tesis de Maestría

Investigación de procesos toxicocinéticos del pesticida metil azinfos en dos especies de invertebrados acuáticos

Cacciatore, Luis Claudio

2009

Tesis presentada para obtener el grado de Magíster de la
Universidad de Buenos Aires en Ciencias Ambientales de la
Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cacciatore, Luis Claudio. (2009). Investigación de procesos toxicocinéticos del pesticida metil azinfos en dos especies de invertebrados acuáticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4505_Cacciatore

Cita tipo Chicago:

Cacciatore, Luis Claudio. "Investigación de procesos toxicocinéticos del pesticida metil azinfos en dos especies de invertebrados acuáticos". Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4505_Cacciatore

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES / UBA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias de la Atmósfera y los Océanos

**INVESTIGACIÓN DE PROCESOS TOXICOCINÉTICOS
DEL PESTICIDA METIL AZINFOS EN DOS ESPECIES DE
INVERTEBRADOS ACUÁTICOS**

Tesis presentada para optar al Título de
Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias Ambientales

Luis Claudio Cacciatore

Directora de Tesis: Dra. Adriana C. Cochón

Codirectora de Tesis: Dra. Noemí R. Verrengia Guerrero

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA. 4º piso, Laboratorio QB66, Pabellón II, Ciudad Universitaria, 1428.

79039

BUENOS AIRES, 2008

Investigación de procesos toxicocinéticos del pesticida metil azinfos en dos especies de invertebrados acuáticos

Resumen

Este trabajo estuvo orientado a investigar la toxicocinética del insecticida organofosforado metil azinfos en el gastrópodo pulmonado, *Biomphalaria glabrata* y en el oligoqueto, *Lumbriculus variegatus*. En trabajos previos se ha demostrado que la exposición *in vivo* por 48 h a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos inhibe un 50% la actividad de las colinesterasas (ChEs) del gastrópodo sin producir sintomatología evidente. En cambio, en el oligoqueto, los síntomas colinérgicos a esa concentración aparecen rápidamente, con inhibición prácticamente total de la actividad ChE. En estas condiciones se ha visto que la recuperación de la actividad ChE durante la fase de depuración es despreciable en ambos invertebrados, aún después de 21 días de encontrarse en un medio no contaminado. Con el objeto de estudiar la absorción y la eliminación del pesticida en los tejidos blandos totales de ambas especies, se desarrolló y validó un método por HPLC para cuantificarlo en medio acuoso, así como, en las muestras de tejidos. Los bioensayos de exposición de los organismos al pesticida se efectuaron en condiciones estáticas durante 24 horas a una concentración de metil azinfos de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. La eliminación del pesticida de los tejidos se evaluó a partir de la transferencia de los invertebrados a un medio no contaminado. Asimismo se determinó el grado de inhibición *in vitro* de las colinesterasas de ambas especies por metil azinfos y su oxo derivado. Estos resultados se compararon con los observados mediante estudios *in vivo*. En su conjunto, los resultados obtenidos brindaron elementos objetivos para demostrar que, en ambas especies, las cinéticas de absorción y eliminación fueron rápidas y similares y que, la mayor sensibilidad a la exposición *in vivo* a metil azinfos de *L. variegatus* se debería, al menos en parte, a la mayor sensibilidad de las colinesterasas del oligoqueto al metabolito activo metil azinfos oxón. En ambos invertebrados, la diferente sensibilidad a la inhibición de la actividad enzimática y la persistencia de dicha inhibición se deberían más a factores toxicodinámicos que a factores toxicocinéticos.

Palabras claves: pesticidas, invertebrados, toxicocinética, colinesterasas

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi gratitud y reconocimiento a la Codirectora de este trabajo, la Dra. Noemí Verrengia Guerrero, quien fue la primera persona que me abrió las puertas y me ayudó a poder concretar esta investigación en el área de la Toxicología Acuática, en la cual es experta.

Quiero remarcar mi profundo respeto y agradecimiento a la Dra. Adriana Cristina Cochón, quien aceptó dirigir esta Tesis de Maestría. Con su humildad, accedió con paciencia a mis sugerencias y me brindó todo su apoyo y experiencia. Además, en cada experimento, resultado o interpretación del mismo, buscó continuamente una respuesta o solución superadora.

A Juliana Rodríguez, que me ayudó de manera desinteresada a conocer los equipos y laboratorios del Departamento de Química Biológica y colaboró con la puesta a punto de diversas técnicas analíticas.

A Gisela Kristoff que me incentivó a continuar y crecer como grupo de trabajo, demostrándome en reiteradas oportunidades su calidez humana.

A mi amigo Javier Urtiaga que, durante muchos domingos, me cubrió en las guardias del Hospital Nacional Prof. Dr. Alejandro Posadas para que pudiera realizar las corridas cromatográficas a partir de horas tempranas de la mañana, para continuar las mismas en la soledad de las madrugadas.

Finalmente, agradezco profundamente a mi compañera de la vida, Patricia, y a nuestras dos hijas, Carolina y Camila, porque conocen mi pasión por la Ciencia y siempre me han dado fuerzas para seguir. Sin ellas, este trabajo no hubiera sido posible.

A mi padre, Andrés Cacciatore

In Memoriam

Para Patricia, Carolina y Camila

Abreviaturas utilizadas

AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	5'-difosfato de adenosina
AsCh	Acetiltiocolina
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BChE	Butirilcolinesterasa
<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
BsCh	Butiriltiocolina
BW284c51	Dibromuro de 1,5-bis (4-alildimetilamoniofenil)-pentano-3-ona
CbE	Carboxilesterasa
ChE	Colinesterasa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CL ₅₀	Concentración letal 50
C ₀	Concentración a tiempo cero de depuración
C _{org}	Concentración de la sustancia química en el organismo
C _w	Concentración de la sustancia química disuelta en el agua
2-PAM	Piridina-2-aldoxima (Pralidoxima)
DTNB	5,5'-ditio-2-bis-nitrobenzoato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBA	Factor de bioacumulación
FBC	Factor de bioconcentración
FBM	Factor de biomagnificación
GSH	Glutación, forma reducida
GST	Glutación-S-Transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
Iso-OMPA	Tetra-(monoisopropil) pirofosforotetramida
K _{ow}	Coefficiente de partición octanol-agua
k ₁	Constante de velocidad de absorción

Abreviaturas utilizadas

k_2	Constante de velocidad de eliminación
<i>L. variegatus</i>	<i>Lumbriculus variegatus</i>
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCBs	Bifenilos policlorados
PBO	Butóxido de piperonilo

	Página
1. Introducción	
1.1 Toxicidad de las sustancias, consideraciones biológicas	1
1.1.2 El medio acuático	3
1.1.3 Factores que afectan la concentración de las sustancias químicas en el ambiente acuático	4
1.1.4 Evaluación de la contaminación utilizando bioensayos	6
1.1.5 Evaluación de la calidad del agua mediante bioensayos	9
1.1.6 Consideraciones acerca de los bioensayos	10
1.1.7 Concepto de biomarcador	11
1.1.7.1 Criterios básicos utilizados en la elección de los biomarcadores	13
1.1.7.2 Relaciones entre la exposición a contaminantes, estado de salud, y respuestas biomarcadoras	14
1.2 Toxicocinética	16
1.2.1 Bioconcentración	17
1.2.1.1 Bioconcentración y modelos unicompartmentales	18
1.2.2 Bioacumulación	19
1.2.3 Biomagnificación	20
1.2.4 Bioconcentración y estructura química	20
1.3 Pesticidas	22
1.3.1 Insecticidas organofosforados	24
1.3.1.1 Metil azinfos	27
1.3.1.2 Destino en el ambiente	31
1.4 Toxicodinamia de los agentes anticolinesterásicos	33
1.4.1 Estructura y actividad de la acetilcolinesterasa (AChE)	33
1.4.2 Características de las sustancias que afectan a la AChE	37
1.4.3 Reactivación química de la AChE inhibida	37
1.4.4 Caracterización de las colinesterasas en invertebrados	37
1.4.4.1 Caracterización de las colinesterasas de <i>B. glabrata</i> y <i>L. variegatus</i>	39
1.5 Algunas características de los invertebrados utilizados	40
1.5.1 <i>Biomphalaria glabrata</i>	40
1.5.1.1 Hábitat y distribución geográfica	40

1.5.1.2	Algunas características biológicas	41
1.5.2	<i>Lumbriculus variegatus</i>	43
1.5.2.1	Hábitat, formas de vida y reproducción	44
1.5.2.2	Anatomía y fisiología	44
1.6	Objetivos	48
	2. Materiales y métodos	49
2.1	Materiales	49
2.1.1	Reactivos	49
2.1.2	Equipos	49
2.1.3	Organismos seleccionados	49
2.2	Métodos	50
2.2.1	Separación y cuantificación del metil azinfos y el metil azinfos oxón	50
2.2.2	Estudio de estabilidad del metil azinfos	51
2.2.3	Ensayo de bioconcentración	51
2.2.4	Determinación de la acción inhibitoria del metil azinfos oxón sobre la colinesterasa por el método de Ellman	53
2.2.5	Determinación del contenido proteico en los homogenatos: método de Lowry	54
2.2.6	Análisis estadístico	55
	3. Resultados	56
3.1	Desarrollo de un método analítico para la separación y cuantificación del metil azinfos por HPLC	56
3.1.1	Separación y cuantificación del metil azinfos	56
3.1.1.1	Curva de calibración	58
3.1.1.2	Linealidad	59
3.1.1.3	Determinación del límite de detección y de cuantificación	60
3.1.2	Estabilidad del metil azinfos en agua	61
3.1.3	Validación del método analítico	63
3.1.4	Eficiencia de extracción del metil azinfos a partir de las matrices biológicas	64

3.2	Toxicocinética del metil azinfos en <i>B. glabrata</i>	67
3.3	Toxicocinética del metil azinfos en <i>L. variegatus</i>	73
3.4	Separación y cuantificación del metil azinfos oxón	77
3.4.1	Curva de calibración del metil azinfos oxón	79
3.5	Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad ChE por metil azinfos y metil azinfos oxón	81
3.5.1	Actividad ChE en los sobrenadantes de homogenatos de <i>B. glabrata</i> en función de la concentración de metil azinfos	81
3.5.2	Actividad ChE <i>in vitro</i> en <i>B. glabrata</i> en función de la concentración de metil azinfos oxón	82
3.5.2.1	Cálculo de la CI ₅₀	83
3.5.3	Actividad ChE <i>in vitro</i> en <i>L. variegatus</i> en función de la concentración de metil azinfos oxón	84
3.5.3.1	Cálculo de la CI ₅₀	85
	4. Discusión	86
	5. Conclusiones	104
	6. Bibliografía	106

1. Introducción

1.1 Toxicidad de las sustancias, consideraciones biológicas

El ambiente está siendo continuamente contaminado con numerosas sustancias orgánicas e inorgánicas liberadas por las comunidades urbanas y la industria. En el siglo XX, diversos tipos de contaminantes orgánicos persistentes, tales como los bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), dibenzofuranos policlorados y dibenzo-p-dioxinas fueron liberados al ambiente. Desde los comienzos de los años 60, la humanidad ha tomado conciencia de los efectos adversos potenciales en el tiempo de estas sustancias químicas en general y sus riesgos para los distintos ecosistemas. El último sumidero para muchos de estos contaminantes es el ambiente acuático, ya sea debido a descargas directas o a procesos hidrológicos y atmosféricos (Stegeman y Hahn, 1994). La presencia de un contaminante en un ecosistema acuático no es, por sí mismo, indicador de efectos perjudiciales (Van der Oost y col., 2003).

Un tóxico es un agente natural o sintético que puede producir un efecto adverso en un sistema biológico, dañando su estructura y/o función en diverso grado y finalmente produciendo la muerte (Rand y col., 1995). En particular, los contaminantes pueden ser introducidos por el ser humano en un ecosistema acuático en forma deliberada o accidental provocando un deterioro de la calidad del agua. Con frecuencia, se establece una distinción entre contaminante (aquel que produce cambios químicos o físicos) y *poluente* (que produce cambios físicos o químicos y que además causa efectos adversos en la biota, su hábitat, una estructura y/o función del ecosistema). El término *polución acuática* significa la introducción por la actividad antropogénica, directa o indirectamente, de sustancias o energía dentro del ambiente acuático provocando un efecto adverso para los recursos vivos, afectando la salud humana, o pérdida de la calidad del agua (GESAMP, 1993). En este contexto, los efluentes pueden considerarse como *poluentes* acuáticos ya que pueden ser tóxicos *per se* y también por alterar las condiciones de las aguas receptoras.

La toxicidad es una propiedad relativa que refleja el potencial de una sustancia química para tener un efecto perjudicial sobre un organismo vivo. La misma es función de la concentración a la cual el organismo es expuesto, así como de la duración de dicha exposición. El fenómeno general de toxicidad puede ser descripto como resultado de un proceso integrado por tres etapas: la fase de exposición, la fase toxicocinética y la fase toxicodinámica (Figura 1.1). La primera está relacionada con la duración del período de

1. Introducción

exposición del organismo y la disponibilidad ambiental del tóxico durante ese tiempo. La fase toxicocinética involucra a los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación del agente tóxico por el organismo. La fase toxicodinámica comprende la respuesta biológica resultante de la llegada del tóxico al sitio de acción y la interacción con los receptores para producir su efecto en el organismo. En este contexto, el proceso tóxico queda definido por las “tres Ps” fundamentales de la toxicología: exPosición, Partición y Potencia (Rand y col., 1995).

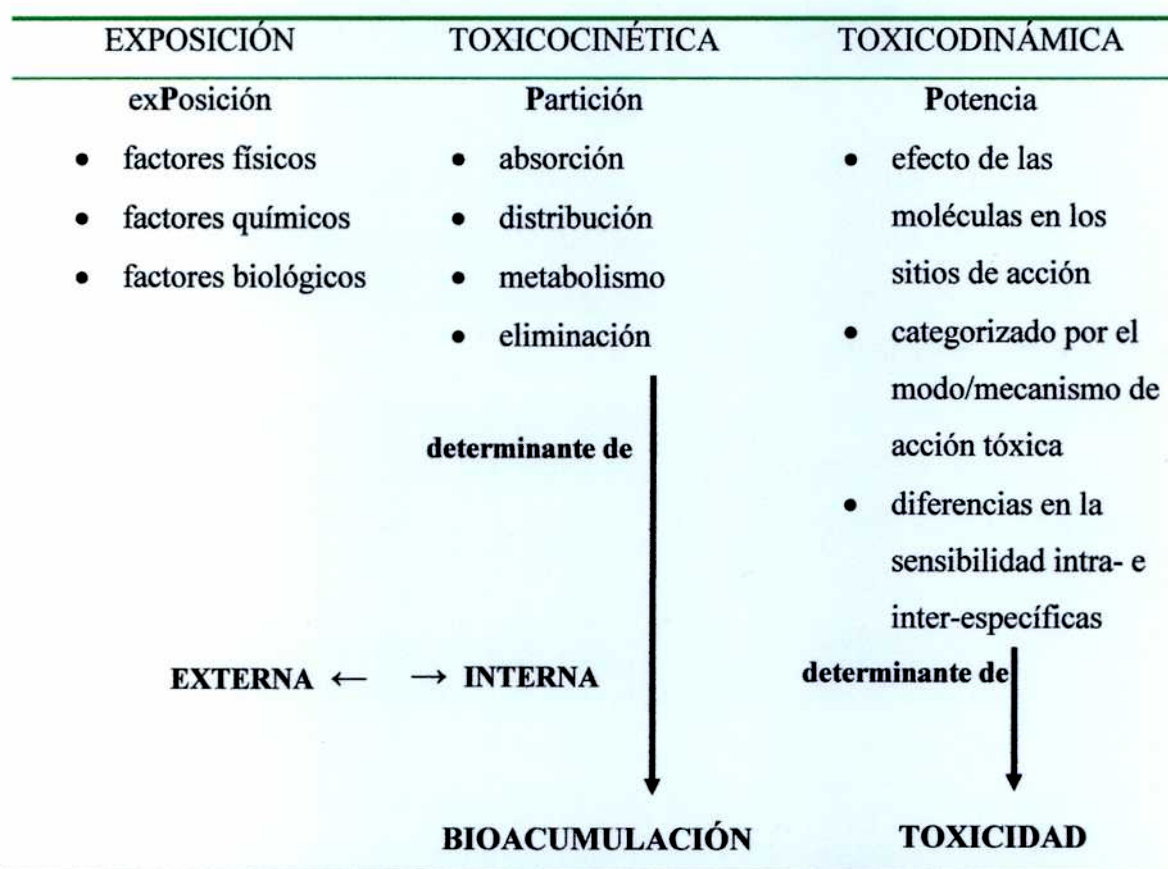


Figura 1.1: Las tres fases de la acción tóxica. Fuente: modificado de Rand y col., 1995

Los efectos tóxicos o adversos pueden ser determinados en laboratorio o en el ambiente natural por exposición aguda o crónica a las sustancias químicas. En una exposición aguda, los organismos entran en contacto con la sustancia por un corto período de tiempo, generalmente de horas o días produciendo efectos inmediatos. Durante las exposiciones crónicas, los organismos se exponen a bajas concentraciones de los tóxicos durante períodos más largos (semanas, meses), medidos en relación al ciclo de vida del organismo prueba. Además, las respuestas de los organismos pueden ser letales o subletales. La toxicidad letal es la acción tóxica que resulta en la muerte de

1. Introducción

los organismos, y la toxicidad subletal es la acción tóxica que resulta en efectos adversos en los organismos previo a la muerte.

Algunos efectos tóxicos son reversibles y otros irreversibles. Los primeros pueden serlo por mecanismos normales de reparación, tales como la regeneración de un tejido dañado o perdido. En aquellos casos en que dichos mecanismos de reparación son insuficientes, el daño se vuelve irreversible y eventualmente puede llevar a la muerte. La evaluación de la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos de un tóxico puede estudiarse mediante los cambios que ocurren al transferir los organismos en estudio desde medios contaminados a medios libres del tóxico, y posterior estudio de parámetros biomarcadores morfológicos, bioquímicos y fisiológicos determinando así la capacidad de respuesta de los mismos (de la Torre, 2001).

Se puede realizar una distinción de los tóxicos de acuerdo al sitio de acción de los mismos. Los efectos localizados ocurren en el sitio primario de contacto. Un ejemplo es la reacción de erosión y/o descamación de las branquias en peces expuestos a varios xenobióticos (Pratap y Wendelaar Bonga, 1993). Para que un compuesto químico tenga acción en otro sitio diferente al primario, debe acceder al medio interno del organismo transportado por el sistema circulatorio hacia un sitio o compartimiento distante.

La toxicidad de ciertos compuestos químicos es considerada no selectiva si producen un efecto no deseado en diferentes tipos de células y tejidos. En contraste, existen los tóxicos selectivos que producen efectos en un solo tipo de células o tejidos (por ejemplo, los insecticidas organofosforados en las sinapsis colinérgicas).

1.1.2 El medio acuático

Las propiedades físicas y químicas de los ecosistemas acuáticos pueden tener un profundo efecto en la actividad biológica. La vulnerabilidad del ambiente acuático frente a la acción de agentes químicos depende de varios factores entre los que se pueden mencionar:

- ✓ propiedades físicas y químicas de las sustancias y de sus productos de transformación o degradación
- ✓ concentraciones y carga total que entra al ecosistema
- ✓ duración y tipo de ingreso (por ejemplo, descarga intermitente, continua o accidental)

1. Introducción

- ✓ propiedades homeostáticas del ecosistema que le permiten tolerar y/o resistir cambios que pudieran ocasionar la presencia de una sustancia química (por ejemplo, capacidad buffer o concentraciones de materia orgánica disuelta) o retornar a su estado original después de que el mismo es removido del sistema
- ✓ ubicación del ecosistema considerado en relación con el sitio de liberación de la sustancia química

Los tóxicos ingresan a los ecosistemas acuáticos a partir de:

- a) fuentes no puntuales (o difusas), tal es el caso de escorrentía superficial y subsuperficial del agua del suelo por actividades de la agricultura, contaminación de napas y sedimentos profundos, escurrimientos urbanos.
- b) fuentes puntuales (o discretas, localizadas) como, por ejemplo, descargas de efluentes provenientes de plantas de procesamiento, depósitos de residuos tóxicos o plantas de tratamiento de aguas servidas.

1.1.3 Factores que afectan la concentración de las sustancias químicas en el ambiente acuático

Un compuesto químico puede existir en el agua bajo tres formas básicas que afecta su disponibilidad a los organismos:

- a) disuelto
- b) adsorbido a componentes bióticos o abióticos, en suspensión en la columna de agua o depositado en el fondo
- c) incorporado dentro de los organismos

Los compuestos químicos disueltos (o hidrofílicos) están fácilmente disponibles para los organismos en el agua. Las sustancias hidrofóbicas (o lipofílicas) pueden adsorberse a los sedimentos, suspensiones coloidales orgánicas, o bien pueden unirse a otras partículas en forma estable y por ello no quedar disponibles para los organismos. No obstante puede ocurrir que, algunos de dichos compuestos químicos, se encuentren disponibles para organismos bentónicos detritívoros.

La biodisponibilidad es un concepto crítico en ecotoxicología ya que los agentes tóxicos que no están biodisponibles tienen, por consiguiente, baja o nula probabilidad de producir cualquier efecto adverso.

La biodisponibilidad ambiental es la fracción del material que un organismo puede incorporar cuando encuentra o procesa un medio (agua o aire). Es una medida

1. Introducción

general de la capacidad de captación de un organismo a partir de la fracción disponible de un material del ambiente, por ejemplo, fracción de una sustancia química extraída por las branquias respecto a una cantidad total en solución luego de pasar a través de la cavidad respiratoria (Rand y col., 1995).

La biodisponibilidad toxicológica es la fracción del tóxico que es absorbida por un organismo, distribuida por la acción convectiva del sistema circulatorio, y presentada a los receptores o sitios de acción tóxica (blanco de acción) (Rand y col., 1995).

La biodisponibilidad ambiental y la toxicológica son estimadores de la eficiencia de extracción, mientras la primera indica el total que ingresa al organismo, la segunda se refiere a la cantidad que alcanza a los receptores del sitio(s) de acción tóxica (Clark y col., 1988; Rand y col., 1995; Van der Oost y col., 2003).

El tiempo promedio que un compuesto químico permanece en un compartimiento particular (por ejemplo, agua, sedimento, biota) antes de ser removido mediante algún proceso de transporte es denominado tiempo de residencia. A pesar de los mecanismos de transporte, la movilidad de las sustancias depende de la partición de las interfases aire-agua y sedimento-agua (Cooney, 1995; Rand y col., 1995; Clements, 2000).

Las sustancias pueden persistir y retener sus características fisicoquímicas mientras son transportadas y distribuidas en el ambiente acuático. Las persistentes pueden acumularse en el ambiente llegando hasta niveles tóxicos. El tiempo de persistencia de una sustancia en un compartimiento determinado puede expresarse en términos de vida media, la que se define como el lapso requerido para reducir su concentración inicial a la mitad. Este concepto implica que el proceso es realizado de acuerdo a una cinética de primer orden, aunque es una simplificación muy utilizada respecto a la persistencia de las sustancias, este supuesto debe ser utilizado con cuidado cuando se hacen inferencias generales acerca de la persistencia de una sustancia (Rand y col., 1995).

Los compuestos químicos pueden convertirse a otras formas como resultado de transformaciones bióticas o abióticas. Las reacciones de transformación abióticas predominantes son la hidrólisis, la oxidación y la fotólisis; estos eventos no metabólicos hacen que la sustancia química esté más o menos disponible para los procesos de transformación biótica (biotransformación). Estas últimas son reacciones enzimáticas en las que, luego de su captación y absorción, las sustancias se transforman en diversos metabolitos (por ejemplo, por oxidación o por hidrólisis) o se conjugan con moléculas

1. Introducción

particulares que generan productos solubles capaces de ser excretados del organismo. Los procesos de biotransformación son realizados por una gran variedad de organismos. Sin embargo, al referirnos a los procesos de biodegradación de compuestos orgánicos presentes en el ambiente acuático, las transformaciones por microorganismos son las más importantes. Estas últimas son las que corresponden a la llamada biodegradación mediante la cual los microorganismos transforman las sustancias químicas y las incorporan dentro del material celular o las utilizan como fuente de energía.

Dentro de ciertos límites, los ecosistemas acuáticos pueden adaptarse a la presencia de los xenobióticos mediante una gran variedad de mecanismos físicos, químicos y biológicos, conocidos genéricamente como homeostáticos posibilitan que las sustancias tóxicas puedan ser asimiladas sin serias consecuencias para la biota endémica. Sin embargo, cuando los contaminantes alcanzan niveles que exceden esa capacidad de los cuerpos de agua receptores, la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de los organismos se ve afectada (Cooney, 1995). Por extensión, la estructura y la dinámica de los niveles siguientes en los ecosistemas pueden verse severamente afectados.

1.1.4 Evaluación de la contaminación utilizando bioensayos

Una de las definiciones que nos parece más amplia para caracterizar al término de bioensayo fue dada por la FAO (1977) y expresa:

“Bioensayo es un ensayo que emplea un organismo, un grupo de organismos o un tejido vivo, para la determinación de la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa y que, en principio, se desconoce”.

Conviene destacar que el término ha tenido diferentes significados, por cuanto los bioensayos pueden adoptar características muy diversas así como servir a múltiples propósitos (Anderson, 1980; FAO, 1987). Durante muchos años se han venido empleando activamente para establecer los niveles óptimos de las dosis de drogas, y para el estudio de los potenciales efectos adversos (Anderson, 1980). De hecho, algunos autores prefieren el nombre de “ensayos de toxicidad”, dado que en muchos casos, constituyen la herramienta experimental para determinar los efectos tóxicos y estudiar los mecanismos involucrados, de las sustancias químicas sobre los seres vivos (FAO, 1987).

1. Introducción

Dentro del campo de la ecotoxicología, los bioensayos pueden ser definidos como (Calow, 1989; Maltby y Calow, 1989):

“El empleo de sistemas biológicos, de variados niveles de complejidad, para establecer el impacto de las sustancias químicas, especialmente aquellas derivadas de la actividad antropogénica, sobre los ecosistemas”.

Básicamente, se reconocen dos tipos de bioensayos, según sea el objetivo que se persiga. Los llamados bioensayos predictivos, cuyo fin consiste en visualizar o pronosticar el impacto de una o varias sustancias químicas antes de que se liberen al medio. Por su parte, los bioensayos de evaluación o de monitoreo permiten establecer el nivel actual de contaminación de un dado medio ambiental (Calow, 1989; Maltby y Calow, 1989).

El rol predictivo de los bioensayos puede interpretarse de la siguiente forma: una perturbación (agente químico) se aplica al sistema (uno o más seres vivos). Éste elabora una respuesta, la cual deberá ser interpretada dentro del entorno ambiental del experimento. El objetivo es pues, estudiar dicha respuesta.

En la práctica, el o los organismos son expuestos, en recipientes adecuados, a concentraciones diversas de una sustancia química (o varias), disuelta convenientemente, de preferencia en agua. Transcurrido cierto período, se observa la respuesta de los organismos. Paralelamente, se efectúa un ensayo control, en el cual los organismos se exponen únicamente al medio de dilución.

Históricamente, podemos decir que la mayoría de los bioensayos predictivos se han basado en experiencias que emplearon una única especie. Las especies más frecuentemente empleadas fueron organismos invertebrados (Verrengia Guerrero, 1995 y 2002). La mayor parte de los trabajos, se concentraron en el estudio de la letalidad, como respuesta, en experiencias realizadas durante cortos períodos, generalmente de 24 a 96 horas (ensayos agudos) (Maltby y Calow, 1989). Por consiguiente, estos bioensayos permiten evaluar el nivel de concentración de una sustancia química necesario para provocar la muerte del 50% de los organismos expuestos: el conocido parámetro de concentración letal 50 (CL₅₀) (Dixon y Newman, 1991).

Según sea el enfoque, estos bioensayos satisfacen los siguientes propósitos:

a) determinar la sensibilidad relativa de diferentes organismos, frente a un dado contaminante (Dorigan y col., 1987).

1. Introducción

b) comparar la toxicidad de los distintos contaminantes en un dado organismo (Waldichuk, 1989).

El parámetro CL_{50} ha sido el protagonista estelar que impulsó el desarrollo de normas y criterios de control de contaminantes en sistemas acuáticos. Ha satisfecho ampliamente la necesidad de los encargados de los organismos de control, y hasta en ocasiones del público en general, por ser un número fácilmente manejable. Lamentablemente, suelen ignorarse muchas de las limitaciones que presenta (Waldichuk, 1989). En primer lugar, suele ser difícil en la práctica comparar los valores de CL_{50} obtenidos por distintos autores, por cuanto las condiciones ambientales, como las propiedades fisicoquímicas del medio de dilución, ni la de los organismos del ensayo, como su edad, sexo, tamaño o aclimatación, están aún lo suficientemente estandarizadas (Waldichuk, 1989; Dixon y Newman, 1991). Además, en este tipo de bioensayos, se ignoran las interacciones químicas y biológicas que pueden verificarse en la naturaleza, por tanto, las interpretaciones resultantes no son estrictamente extrapolables (Connell, 1987; Waldichuk, 1989).

En los bioensayos de evaluación o monitoreo, la respuesta que elabora el organismo sirve para estimar el nivel de perturbación al que ha sido sometido. En este tipo de bioensayos invariablemente se emplean organismos que se han criado y mantenido en condiciones de laboratorio preestablecidas y preferentemente normatizadas, los cuales se exponen al medio cuya toxicidad se pretende evaluar. Este medio puede consistir en muestras de distintos cuerpos de aguas, efluentes o descargas específicas, extractos acuosos o eluatos de suelos, sedimentos u otro tipo de material sólido, preparadas convenientemente de acuerdo a cada bioensayo en particular (Bitton y Dutka, 1986).

Una gran variedad de organismos ha sido empleada en este tipo de estudios. En un principio se recurrió a ciertas especies de peces, de algas o de algunos invertebrados, mediante ensayos a corto o largo plazo. Desde hace varios años, fueron surgiendo una serie de pruebas rápidas, a corto plazo, que se reconocen en general como “microbioensayos”. Diversas cepas bacterianas, nematodos, pequeños crustáceos, protozoos y semillas vegetales, suelen ser los sistemas biológicos más empleados. La mayoría de estas pruebas se basa en el estudio de respuestas tales como mortalidad, inmovilización o inhibición de la actividad de algunas enzimas. Las principales ventajas de estos bioensayos consisten en su simplicidad metodológica, requieren poco espacio y equipamiento, al igual que un pequeño volumen de muestra, resultando en general

1. Introducción

económicos y aptos para estudios rutinarios, aún cuando estos involucren un gran número de muestras (Dutka, 1988 y 1991; US EPA, 1991; Bitton y Koopman, 1992).

El grado de toxicidad de las distintas muestras se determina en forma cualitativa, o incluso semicuantitativa, en base a la intensidad de la respuesta que elabora el sistema biológico empleado (Bitton y Dutka, 1986; Dutka, 1991).

Su principal desventaja reside en que si bien puedan reconocer o detectar la toxicidad del medio, no permiten identificar las sustancias químicas que las provocan. Sin embargo, ya están disponibles algunos microbioensayos capaces de reaccionar únicamente frente a determinadas familias o grupo de compuestos, como ciertos elementos metálicos o plaguicidas (Bitton y Koopman, 1992).

Los estudios de laboratorio de toxicidad acuática se enfocan hacia los efectos tóxicos directos, los orientados a campo incluyen consideraciones sobre efectos indirectos y cambios en comunidades y poblaciones expresados a menudo en forma de índices biológicos. Otro enfoque alternativo es el estudio de ecosistemas experimentales mediante el cual se ponen poblaciones de dos o más especies (frecuentemente representando distintos niveles tróficos) en forma conjunta al *poluente* o tóxico a evaluar. Estos ecosistemas experimentales varían en escala y complejidad. Los sistemas a escala pequeña (microcosmos) ofrecen la ventaja de un control más preciso de las condiciones experimentales, mientras que aquellos realizados a escala mayor (mesocosmos) representan mejor a los sistemas naturales pero presentan la dificultad de ser casi irreproducibles.

Los bioensayos ofrecen varias ventajas al comparar la toxicidad relativa de determinadas sustancias químicas o sus mezclas (por ejemplo, efluentes). Sin embargo, los ensayos de toxicidad presentan limitaciones al ser aplicados al monitoreo biológico ya que la mayoría de ellos no reporta los efectos de la especiación química en el ambiente, cinética de los compuestos químicos al sedimento, bioacumulación o biomagnificación.

1.1.5 Evaluación de la calidad del agua mediante bioensayos

Los cuerpos de agua naturales son el último destino de la mayoría de las sustancias tóxicas. El control y manejo del ingreso de dichas sustancias es difícil porque los contaminantes a menudo ingresan al ecosistema acuático a partir de fuentes múltiples o difusas.

1. Introducción

Si bien el análisis fisicoquímico del agua permite cuantificar las sustancias tóxicas presentes en el medio acuático, no permite arribar a conclusiones sobre el efecto de la misma sobre la biota. Por el contrario, los bioensayos de toxicidad permiten determinar en qué momento las concentraciones de contaminantes presentes en el medio son lo suficientemente elevadas como para causar efectos adversos en los organismos. En este contexto, la utilización de bioensayos a modo de técnica de evaluación se ha difundido como instrumento válido para determinar la calidad de las aguas.

1.1.6 Consideraciones acerca de los bioensayos

Los ensayos de toxicidad en laboratorio son herramientas muy útiles en evaluaciones de la calidad del agua y han sido ampliamente utilizados tanto en el sector público como el privado en las pasadas dos décadas.

Los bioensayos de toxicidad se realizan utilizando protocolos de laboratorio estandarizados con especies recomendadas por organismos internacionales tales como la U.S. Environmental Protection Agency (US EPA), American Society for testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). La utilización de especies nativas diferentes a las recomendadas por dichos organismos debe estar avalada por información de la nueva especie prueba propuesta, demostrando que la misma cumple con una serie de pautas que sugieran una sensibilidad equivalente a la especie prueba recomendada para esa categoría. Al respecto, la US EPA bajo el programa National Pollutant Discharge Elimination System (NPDES) define alguno de los criterios más importantes.

Entre ellos se propone la consideración de:

- ✓ la sensibilidad de la especie a sustancias tóxicas que suelen estar presentes en los efluentes
- ✓ la relación filogenética y ecológica similares a la especie recomendada por la US EPA; importancia ecológica, comercial y/o recreacional (por ejemplo, ser integrante importante en la cadena trófica del sistema)
- ✓ la disponibilidad de los estadios iniciales de vida de la especie a lo largo de todo el año
- ✓ la facilidad de su cría y manutención en condiciones de laboratorio
- ✓ la tolerancia para el manejo y las condiciones de laboratorio, esto es, que no se deben producir cambios importantes en los organismos durante su ciclo de vida,

permitiendo realizar un eficaz cultivo, crecimiento, manutención y testeo bajo condiciones de laboratorio

1.1.7 Concepto de biomarcador

Los biomarcadores fueron originalmente definidos como cualquier alteración o manifestación bioquímica, histológica, o fisiológica de estrés ambiental (NRC, 1987).

Según el NRC (1987), WHO (1993), los biomarcadores pueden ser subdivididos en tres clases:

- ✓ biomarcadores de exposición: abarcan la detección y medición de una sustancia exógena o sus metabolitos o el producto de la interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula blanco o célula que se mide en un compartimiento dentro de un organismo
- ✓ biomarcadores de efecto: incluyen la medición de alteraciones bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo que pueden ser reconocidas como asociadas a un establecido o posible impedimento en la salud o enfermedad
- ✓ biomarcadores de susceptibilidad: indican la capacidad inherente o la habilidad adquirida de un organismo para responder a los cambios de exposición a una sustancia xenobiótica específica, incluyendo factores genéticos y cambios en los receptores los cuales alteran la susceptibilidad de un organismo a dicha exposición

Más recientemente, la definición de biomarcador aportada por el NRC (1987) ha sido cuestionada por varios autores (McCarty y Munkittrick, 1996; Engel y Vaughan, 1996) y el término biomarcador es ahora comúnmente usado en un sentido más restrictivo, es decir a cambios bioquímicos subletales resultantes de la exposición a contaminantes. En la Tabla 1.1 podemos ver un resumen de la mayor parte de los marcadores bioquímicos que han sido usados para evaluar los perjuicios sobre las funciones biológicas en los organismos (Hyne y Maher, 2003).

En su mayor parte, los estudios sobre biomarcadores bioquímicos son llevados a cabo en organismos expuestos a tóxicos seleccionados bajo condiciones de laboratorio controladas. Estos estudios pueden ayudar a establecer relaciones de causa y efecto que pueden ser aplicadas para predecir efectos de contaminantes específicos sobre poblaciones naturales a campo (Clements, 2000). Sin embargo, un número de factores

1. Introducción

bióticos y abióticos puede influenciar la extrapolación de biomarcadores individuales durante el monitoreo a campo de efectos contaminantes en la población y en los niveles de la comunidad. Las relaciones entre las respuestas del biomarcador y la población o las estructuras y funciones de la comunidad son complejas por la existencia de mecanismos compensatorios los cuales regulan la dinámica poblacional en sistemas naturales (Clements, 2000).

La implementación de biomarcadores moleculares en invertebrados ha sido limitada. Muchos de los primeros trabajos con ellos implicaron la adaptación de ensayos biomarcadores (por ejemplo, inducción de citocromo P450), los cuales fueron bien establecidos en vertebrados. Sin embargo, se ha vuelto rápidamente aparente cómo pueden diferir los invertebrados de los vertebrados, y esto marca una clara necesidad para realizar trabajos sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos básicos que condicionan la toxicidad en los invertebrados acuáticos y terrestres (Livingstone, 1992 y 1993; Walter y col., 1995; Gunning y col., 1998).

Tabla 1.1: Resumen de los principales biomarcadores de exposición actualmente usados para evaluar funciones biológicas alteradas. Fuente: Hyne y Maher, 2003

Biomarcador	Tejido	Uso como indicador de:
Oxidasa de función mixta	Hígado	Exposición a químicos orgánicos tales como PAHs y PCBs
Glutation-S- transferasas	Hígado	Exposición a pesticidas y metaloides
Celulasa/carbohidrasa	Estómago	Exposición a pesticidas
AChE	Cerebro	Exposición a pesticidas organofosforados o carbamatos
Carboxilesterasa	Varios	Exposición a piretroides y carbamatos
ADN, ruptura de cadena, formación de aductos	Varios	Exposición a agentes alquilantes o arilantes
Ácido aminolevulínico dehidratasa	Sangre	Exposición a plomo
Metalotioneína	Varios	Exposición a metales
Retinoides	Hígado	Exposición a dioxinas y furanos
Porfirinas	Hígado	Exposición a hidrocarburos aromáticos clorados
Relación ATP/ADP	Varios	Exposición a estrés
Proteínas de estrés	Varios	Células sometidas a estrés
Glutación	Hígado	Estrés oxidativo

1.1.7.1 Criterios básicos utilizados en la elección de los biomarcadores

El uso de los biomarcadores para evaluar exposición y efectos enfrenta varios problemas; una apropiada elección de un biomarcador para el monitoreo de exposición y efectos de tóxicos requiere la consideración de los siguientes factores (Hyne y Maher, 2003):

- ✓ el biomarcador debe ser de fácil medición permitiendo realizar su cuantificación en múltiples individuos. Aquellos parámetros cuya medición consume mucho tiempo, es onerosa y requiere equipo sofisticado, es en general, de poca utilidad en la medición de los efectos
- ✓ es necesario delimitar su grado de variabilidad natural y conocer las respuestas biomarcadoras de los organismos frente a un amplio conjunto de factores ambientales, por ejemplo, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, sólidos en suspensión así como también considerar variables como edad, sexo, peso, ciclo reproductivo, estado nutricional. En general, al trabajar con organismos estandarizados, se dispone de gran parte de esta información, sin embargo, es necesario disponer de datos propios, independientemente de la especie que sea utilizada, que permitirán establecer consideraciones a escala regional
- ✓ el biomarcador debe responder de una forma dosis o tiempo dependiente, pudiendo obtenerse una cuantificación de la relación entre el nivel de la respuesta obtenida y el grado de exposición al tóxico
- ✓ el biomarcador debe ser sensible a niveles de concentraciones subletales. Es conveniente establecer con la mayor precisión los límites de detección y la sensibilidad del mismo
- ✓ la medición propuesta debe tener significado biológico. Los biomarcadores a utilizarse deben vincularse con procesos biológicos importantes para poder interpretar correctamente los cambios detectados. En algunos casos es importante acreditar la especificidad de la respuesta de los biomarcadores, verificando experimentalmente la vinculación entre un compuesto químico (o familia de compuestos químicos) y la respuesta determinada

1.1.7.2 Relaciones entre la exposición a contaminantes, estado de salud, y respuestas biomarcadoras

En la Figura 1.2a, se observa una relación entre el tiempo de exposición a un contaminante y los consiguientes efectos, por ejemplo, el aumento de la concentración en los tejidos con el tiempo cuando existe una exposición continua a una concentración constante de la sustancia en el alimento, en el ambiente acuático, o el aire. El eje de las abscisas mide el estado fisiológico y el eje de las ordenadas cuantifica el estado de salud.

Cuando los niveles de la sustancia son suficientemente bajos, no hay alteración de la homeostasis y el organismo permanece saludable. Cuando la concentración aumenta, sin embargo, los organismos se estresan y deben gastar energía en mecanismos de defensa (por ejemplo, inducción de enzimas o metalotioneinas) en un intento de reducir el efecto adverso del *poluente*. Si la concentración de la sustancia aumenta aún más, se produce un daño tóxico y el organismo entrará en un estado reversible de enfermedad. En esta etapa las proteínas del estrés actúan para reparar el daño celular. Finalmente, un incremento mayor en la concentración conducirá a un estado irreversible de enfermedad y el organismo morirá en poco tiempo.

En la Figura 1.2b, un cierto número de respuestas biomarcadoras indican la medición de diferentes estados en el tiempo, relacionados con el proceso de intoxicación. El biomarcador B1 muestra una relación similar a los parámetros de toxicidad que han sido bien establecidos para la inhibición de la AChE cerebral de los vertebrados por organofosforados. Con las aves, por ejemplo, la inhibición por encima del 40% puede ser tolerada sin síntomas evidentes de toxicidad. En el rango de aproximadamente un 40 a 75%, se observan ciertas características fisiológicas y efectos sobre la conducta. Por encima de este rango, se producen los síntomas extremos de neurotoxicidad, lo que conduce rápidamente a la muerte. El biomarcador B2 puede representar la inducción de una enzima con una función detoxificante que no se mantiene cuando el organismo entra en el estado de enfermedad. En el caso de B3 se representa la producción de proteínas del estrés para reparar los daños celulares causados por el xenobiótico y los biomarcadores B4 y B5 pueden representar daño celular reversible e irreversible respectivamente, por ejemplo, disrupción lisosomal, en las últimas etapas de la intoxicación (Walker, 1998).

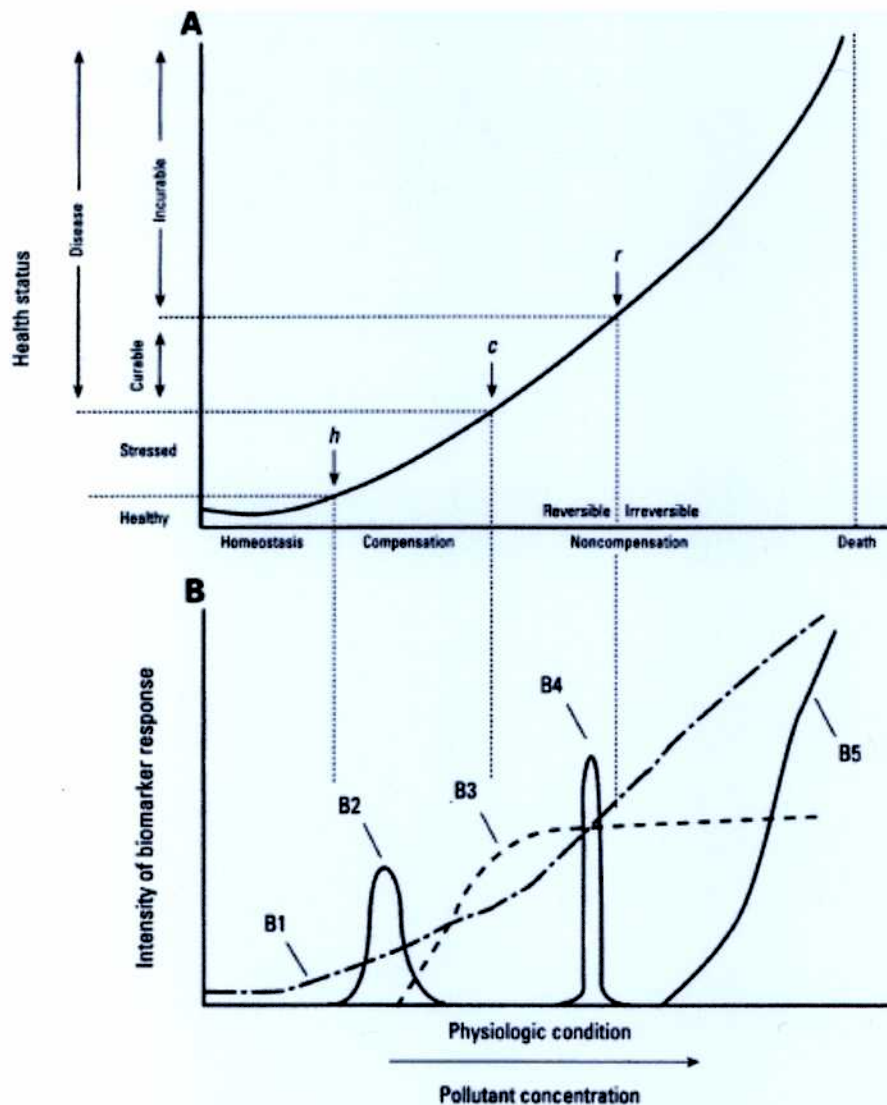


Figura 1.2: Relaciones entre la exposición a contaminantes, el estado de salud, y las respuestas biomarcadoras. (a) Progresión del estado de salud de un individuo en función del aumento de exposición a un contaminante: h, punto a partir del cual la desviación de la respuesta homeostática normal es iniciada; c, límite a partir del cual las respuestas compensatorias pueden prevenir el desarrollo manifiesto de enfermedad; r, límite a partir del cual el daño patológico es irreversible a pesar de los mecanismos de reparación. (b) Respuesta de cinco biomarcadores hipotéticos usados para evaluar la salud del individuo. Fuente: Walker, 1998

1.2 Toxicocinética

La toxicocinética es la disciplina que estudia los procesos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación de xenobióticos en el organismo, con el objetivo de calcular su concentración y la evolución de la misma en el tiempo.

Los organismos heterótrofos obtienen el oxígeno por respiración a partir del aire o del oxígeno disuelto en el agua. Esta respiración puede resultar en ambos casos un mecanismo de absorción y depuración de sustancias químicas, usualmente por un proceso de difusión pasiva. Para los metales y algunos otros compuestos inorgánicos puede haber absorción activa y las velocidades de difusión dentro y fuera del organismo difieren. La absorción también puede ser cutánea. Para pequeños animales, ésta puede ser una importante vía de captación o de depuración pero para los animales más grandes es menos importante dado que la respiración es activamente inducida para impulsar agua o aire dentro de la branquia o el pulmón. Otra ruta importante de absorción es el alimento ingerido como fuente de masa y energía e, inadvertidamente, de contaminantes.

Además de la depuración a través de la respiración y las pérdidas por la piel, la cual es un proceso por difusión, y entonces un proceso reversible de transferencia, puede haber pérdidas por excreción de materia fecal y orina y la conversión metabólica de la sustancia a otra usualmente más oxigenada y soluble en agua en los órganos internos, particularmente el hígado. Puede haber también una depuración aparente o reducción en la concentración por el efecto de dilución que produce el crecimiento, es decir, la concentración cae como resultado de la misma cantidad de materia que está siendo distribuida en un mayor volumen de tejidos. En el caso de las hembras la pérdida de sustancias puede deberse a procesos reproductivos, por ejemplo, en aves durante la postura, en mamíferos durante la lactancia.

La toxicocinética clásica se basa en el uso de modelos compartimentales, en los que distintos órganos o tejidos se agrupan en función de ciertas características en los llamados compartimientos, que se suponen homogéneos a efectos del comportamiento del xenobiótico (Moreno Grau, 2003).

1.2.1 Bioconcentración

Como consecuencia de la incorporación de contaminantes por un dado organismo durante un cierto período, se pueden alcanzar niveles de concentración en sus tejidos prácticamente constantes, de tal manera que el proceso llega a un estado estacionario (Streit, 1992). Bajo estas condiciones, el grado de bioconcentración puede ser cuantificado mediante diversos parámetros. Así, puede ser expresado en términos de:

- a) concentraciones de masa, esto es la cantidad de un compuesto químico por unidad de biomasa.
- b) por el peso del organismo, seco o húmedo.
- c) por cantidad de lípidos, especialmente empleado frente a compuestos altamente lipofílicos (Streit, 1992).

Otra forma de expresión, ampliamente difundida, consiste en el empleo del llamado factor de bioconcentración (FBC) y se define como la relación de la concentración de la sustancia química en un organismo y la concentración de la sustancia en algún compartimiento o subcompartimiento del sistema acuático (Walker, 1990; Streit, 1992).

La bioconcentración en organismos acuáticos involucra la captación de sustancias químicas por absorción sólo a partir del agua (usualmente bajo condiciones de laboratorio), lo cual puede ocurrir por la superficie de la vía respiratoria y/o la piel, dando por resultado que la concentración de la sustancia en un organismo acuático es mayor que en el agua (Mackay y Fraser, 2000). Así, por ejemplo, si tomamos en cuenta sólo la fracción del contaminante que está disuelta en el agua y biológicamente disponible para su absorción, podemos definir al FBC en el estado estacionario aparente mediante la siguiente relación:

$$FBC = C_{org} / C_w$$

donde:

C_{org} , es la concentración de la sustancia química en el organismo

C_w , es la concentración de la sustancia disuelta en el agua

1.2.1.1 Bioconcentración y modelos unicompartmentales

El modelo compartimental más sencillo es el formado por un único bloque o compartimiento.

Los modelos unicompartmentales consideran que la totalidad del organismo se comporta de forma homogénea.

Desde el punto de vista experimental, estos modelos se aplican en aquellos casos en los que al pasar a un organismo de una situación de exposición a un ambiente libre del xenobiótico, la evolución en el tiempo de su concentración en sangre o en los tejidos decrece exponencialmente.

En un modelo unicompartmental, la concentración de un xenobiótico en un organismo acuático es descripta como el resultado de una cinética de primer orden tanto en la absorción como en la eliminación (Hamelink y col., 1971; Spacie y Hamelink, 1982; Legierse y col., 1998; Gobas, 1993 y 2000):

$$dC_{org}/dt = k_1 \cdot C_W - k_2 \cdot C_{org}$$

En esta ecuación, k_1 es la constante de velocidad de absorción ($ml\ g^{-1}\ h^{-1}$) y k_2 es la constante de velocidad de eliminación (h^{-1}); C_W es la concentración de exposición en el agua del xenobiótico ($\mu g\ ml^{-1}$) y C_{org} es la concentración del compuesto en el organismo acuático ($\mu g\ g^{-1}$). Frente a una concentración de exposición constante, esta ecuación puede ser integrada como:

$$C_{org} = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (1)$$

En una situación de estado estacionario ($dC_{org}/dt = 0$) esta ecuación se puede simplificar a:

$$FBC = \frac{C_{org}}{C_W} = \frac{k_1}{k_2}$$

Las constantes k_1 y k_2 pueden determinarse a través del ajuste matemático por iteraciones múltiples a la ecuación (1) de los datos obtenidos durante la fase de absorción.

1. Introducción

Por otro lado, la constante de eliminación k_2 experimental puede calcularse a partir de experimentos de depuración según la siguiente ecuación:

$$dC/C = -k_2 dt$$

cuya integral es:

$$C = C_0 e^{-k_2 t}$$

Donde C_0 es la concentración a tiempo cero de depuración.

La expresión anterior puede convertirse en una relación lineal tomando logaritmos, con lo que resulta:

$$\ln C = \ln C_0 - k_2 t$$

Es decir, la ecuación de una recta cuya ordenada en el origen es el logaritmo natural de la concentración inicial y cuya pendiente es el opuesto de la constante de velocidad.

A partir de la ecuación anterior puede obtenerse fácilmente el tiempo de vida media de un xenobiótico, esto es, el tiempo necesario para que la concentración de dicho compuesto descienda hasta alcanzar un valor igual a la mitad de su concentración inicial. El tiempo de vida media se obtiene sustituyendo la concentración C por el valor $C_0/2$ en las ecuaciones anteriores:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_2 = 0,693 / k_2$$

1.2.2 Bioacumulación

La bioacumulación es el proceso por el cual se produce un incremento de la concentración del xenobiótico en un organismo acuático comparada con la presente en el agua, debido a la captación por todas las rutas de exposición incluyendo absorción por la dieta, transporte a través de las superficies respiratorias y absorción cutánea (Mackay y Fraser, 2000).

La bioacumulación puede así ser vista como una combinación de bioconcentración y captación a través del alimento.

El factor de bioacumulación (FBA) se calcula de manera similar al caso anterior.

1.2.3 Biomagnificación

La biomagnificación puede ser considerada como un caso especial de bioacumulación en el cual la concentración del xenobiótico en el organismo excede a la que se encuentra presente en los organismos que componen su dieta debido a la absorción a través del alimento (Mackay y Fraser, 2000; Gobas, 1993; Gobas y Morrison, 2000). El factor de biomagnificación (FBM) puede ser definido como la relación de la concentración de la sustancia en el organismo C_B con relación a la que se encuentra en la dieta C_A y puede ser expresada como:

$$FBM = C_B/C_A$$

1.2.4 Bioconcentración y estructura química

El uso de correlaciones empíricas para describir el fenómeno de bioconcentración en organismos acuáticos usando las propiedades fisicoquímicas de las sustancias fue reportado por Nelly y col. (1974). Estos investigadores trabajaron con la trucha arco iris; las velocidades de absorción y depuración de una variedad de contaminantes se midieron experimentalmente en el laboratorio. Como resultado de sus investigaciones, obtuvieron una ecuación de regresión lineal a partir de un gráfico del log FBC en función log K_{ow} .

Existe un acuerdo general en que la lipofilidad de una sustancia es el principal requisito previo de potencial bioacumulación en los organismos. De ahí, que la mayor parte de las actuales relaciones cuantitativas de estructura química y actividad biológica se basan en el coeficiente de reparto octanol-agua, en la que el n-octanol es utilizado como un sustituto del compartimiento de grasa en el organismo. Además, se supone que la aplicación de tales correlaciones permite predecir el FBC. Sin embargo, esa correlaciones sólo son aplicables bajo la premisa que la lipofilidad y la hidrofiliidad son inversamente proporcionales, pero no en los casos donde las sustancias son poco solubles tanto en octanol como agua o solubles en cualquier proporción, ambas posibilidades resultan eventualmente en un bajo K_{ow} y de esta manera no predicen una potencial bioacumulación. Asimismo, no se considera por estos modelos estructuras químicas bipolares, tales como agentes tensioactivos y sustancias con ciertas estructuras nitrogenadas solubles en agua como compuestos de bupiridinio y de amonio cuaternario, los cuales a pesar de su bajo K_{ow} y su alta solubilidad en agua pueden ser considerablemente bioacumulados y, por consiguiente, incorrectamente evaluados. Así,

1. Introducción

por ejemplo, el herbicida paraquat es bioacumulado y adsorbido en caracoles más de 200 veces y también induce la mortalidad de los renacuajos que se alimentan de plantas contaminadas con paraquat (Wiegand y col., 2007).

La correlación entre el coeficiente de partición n-octanol/agua, calculado como el $\log K_{ow}$, y el factor de bioconcentración, calculado como el $\log FBC$, demostró ser deficiente en algunos tipos de productos químicos, ya que no se han tenido en consideración los factores que influyen en la bioacumulación en los organismos, incluyendo por ejemplo:

- ✓ fenómenos de transporte activo
- ✓ la influencia sobre el comportamiento de la difusión a través de las membranas celulares
- ✓ el metabolismo de los diversos organismos y acumulación de los metabolitos
- ✓ la acumulación en órganos y tejidos específicos (también por adsorción en superficies biológicas tales como branquias y piel)
- ✓ propiedades estructurales especiales (por ejemplo, sustancias anfífilas, disociación de sustancias que conducen a múltiples procesos de equilibrio)
- ✓ cinéticas de absorción y de eliminación, estado estacionario de la sustancia o de los metabolitos

A pesar de estas limitaciones se acepta internacionalmente que valores del $\log K_{ow}$ mayores o iguales a 3 indican que la sustancia puede bioacumularse.

En los pocos trabajos publicados de bioconcentración de contaminantes en peces e invertebrados se destaca el hecho de que muchos de los resultados obtenidos no pueden explicarse satisfactoriamente con sólo el conocimiento de los parámetros fisicoquímicos del xenobiótico, tal es el caso del K_{ow} (Tsuda y col., 1989; Sancho y col., 1994b, 1996; Ramírez Mora y col., 2000; Klosterhaus y col. 2003).

Al día de la fecha, son muy pocos los trabajos de cinéticas de absorción y de eliminación de xenobióticos y de bioacumulación en invertebrados. Menos aún son las investigaciones toxicocinéticas realizadas con compuestos orgánicos poco o moderadamente persistentes, tal es el caso del insecticida organofosforado metil azinfos.

1.3 Pesticidas

Un pesticida es cualquier producto químico destinado a luchar contra “pestes”, o sea, parásitos, animales o vegetales, que amenacen los cultivos agrícolas, la ganadería o la salud humana. Tal definición es muy amplia, pero una tácita convención restringe su alcance: de los pesticidas se excluyen los medicamentos y productos farmacéuticos, considerando solamente como tales, los productos que se emplean para combatir parásitos externos (Barberá, 1989).

La FAO/OMS define el término pesticida como “*cualquier sustancia o mezcla de ellas estudiada para prevenir o controlar cualquier especie de plantas o animales indeseables, incluyendo también cualquier otra sustancia o mezcla de ellas destinadas a utilizarse como regulador de crecimiento de las plantas, o defoliantes o desecantes.*”

La Figura 1.3 representa un modelo conceptual que describe el destino de un pesticida utilizado en agricultura.

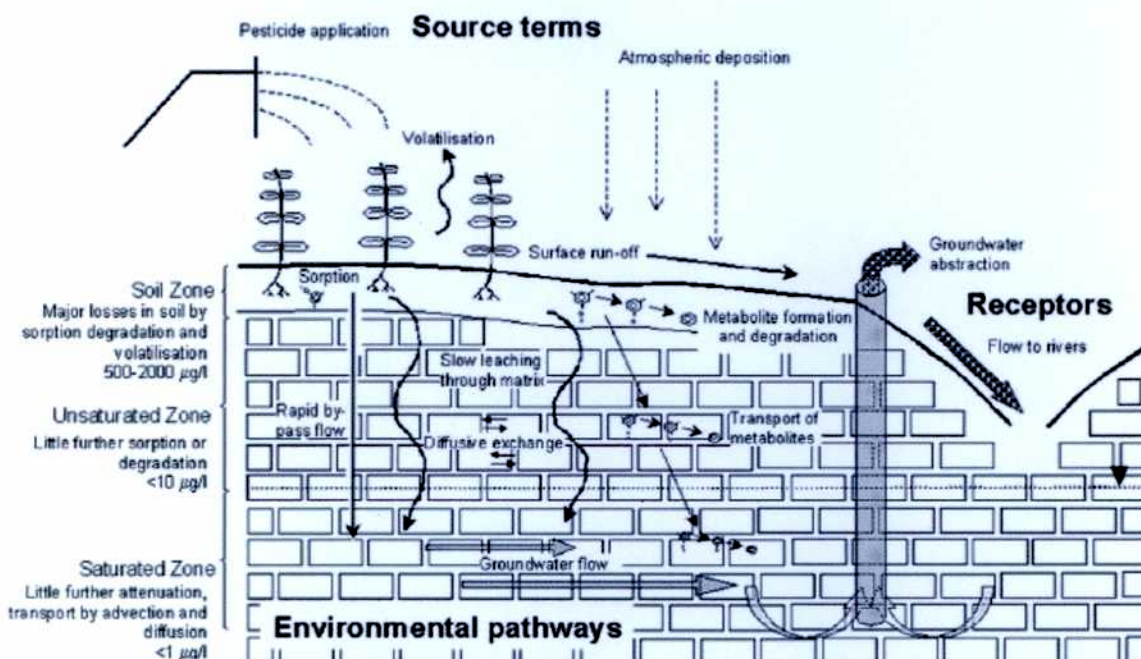


Figura 1.3: Destino de los pesticidas en el ambiente. Fuente: Bloomfield y col., 2006

Los pesticidas utilizados en agricultura pueden ser aplicados a los suelos desnudos, interceptados por los cultivos o perdidos como deriva de los aerosoles. Para aquellos que se depositan en el suelo hay una partición entre la fase sólida del suelo y el espacio poroso ocupado por agua y aire. El pesticida puede ser eliminado del sistema suelo-agua-aire a la atmósfera a través del proceso de volatilización; esta pérdida es

1. Introducción

esencialmente un proceso de dos etapas: en primer lugar, la evaporación de moléculas procedentes de residuos del pesticida en los suelos o en el cultivo, y secundariamente, la disipación de estas moléculas en la atmósfera por difusión y mezcla turbulenta. Las pérdidas acumuladas por volatilización pueden alcanzar desde un bajo porcentaje hasta un 50% de la dosis aplicada lo que depende de las propiedades del pesticida (Bloomfield y col., 2006). El remanente del compuesto químico en el suelo se particionará entre el suelo y el agua del suelo; la relación entre la concentración en el suelo y la concentración en el agua recibe el nombre de coeficiente de sorción. El plaguicida es eliminado del ambiente edáfico mediante volatilización, absorción por las plantas, escorrentía hacia arroyos y ríos, lixiviación al agua subterránea, y por degradación abiótica y microbiana. Los procesos de transformación cambian la estructura química original a uno o varios compuestos diferentes, a menudo referidos como productos de degradación o metabolitos, lo que conduce por último a la completa mineralización del pesticida. Las transformaciones pueden ocurrir por numerosos procesos: oxidación, hidrólisis, fotólisis y biodegradación. Para la mayoría de los pesticidas, la biodegradación es el proceso de transformación más importante en el suelo. En la práctica, el proceso de biodegradación es usualmente caracterizado por su vida media, ésta es el tiempo necesario para que la concentración de la sustancia disminuya en un 50%. La vida media de un pesticida varía con la temperatura, el contenido de agua y materia orgánica del suelo (Bloomfield y col., 2006).

La escorrentía describe el movimiento lateral del agua, ya sea sobre la superficie o por medio de la parte superior de las capas del suelo y así, poder alcanzar un curso de agua. Este proceso se ve favorecido en suelos pobremente drenados en donde los eventos de escorrentía pueden también promover la erosión de partículas del suelo y el transporte de los pesticidas adsorbidos.

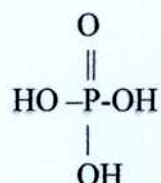
En teoría, el movimiento vertical de un pesticida en el suelo debería ser bajo comparado con su vida media, de manera tal que una mínima fracción del compuesto pudiese ingresar al agua subterránea. Sin embargo, la presencia de macroporos puede permitir un movimiento vertical rápido del compuesto químico y contaminar los acuíferos. El destino y transporte de un contaminante en el agua subterránea incluye procesos de advección, dilución, dispersión, difusión, partición y degradación. El transporte advectivo de los plaguicidas en los acuíferos está dado por los gradientes hidráulicos y la velocidad de transporte es función de la conductividad hidráulica y la

1. Introducción

porosidad. La dispersión resulta en la reducción de la concentración del pesticida mediante mecanismos de mezcla o dilución a lo largo del flujo del agua subterránea.

1.3.1 Insecticidas organofosforados

Los insecticidas organofosforados pueden considerarse como derivados del ácido fosfórico (Tabla 1.2):



En esta fórmula la sustitución de todo los grupos -OH por grupos -OR (R= radical orgánico) origina los ésteres del ácido fosfórico. Pero caben aun más sustituciones como son:

- ✓ del enlace P=O por el enlace P=S, originando así los tionofosfatos (O, fosforotioatos)
- ✓ del grupo -OR por un grupo -SR, originando tiolfosfatos (S, fosforotioatos)
- ✓ sustitución simultánea de P=O por P=S y de -OR por -SR dando lugar a los tionotiofosfatos (fosforoditioatos)
- ✓ Sustitución de -OR por un radical orgánico -R, originando fosfonatos
- ✓ Sustitución de grupos -OR por grupos -X (halógeno, como cloro, bromo), creándose así los halogenofosfoatos
- ✓ Sustitución de -OH por grupos -NH₂ originando amidofosfatos

1. Introducción

Tabla 1.2: Tipos de Organofosforados

Tipo	Estructura Química	Ejemplos
Fosfatos	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	Clorfenvinfos Diclorvos Monocrotofos
Fosfonatos	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	Triclorfon
Fosfinatos	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	Glufosinato
Fosforotioatos (S=)	$ \begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	Bromofos Diazinon Fention Paration Metil-pirimifos
Fosfonotioatos (S=)	$ \begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	Leptofos
Fosforotioatos (S-sustituídos)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	S-metil-Demeton Ecotiofato
Fosfonotioatos (S-sustituídos)	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RS}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array} $	

1. Introducción

Fosforoditioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{OR} \end{array} \quad \text{ó}$ $\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Etil azinfos Metil azinfos Dimetoato Disulfoton Malation Metidation
Fosforotritioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{SR} \end{array}$	Tribufos
Fosforoamidatos	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{R} \\ \quad \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Fenamifos
Fosforoamidotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \quad \text{R} \\ \quad \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array} \quad \text{ó}$ $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{R} \\ \quad \\ \text{RS}-\text{P}-\text{N}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Metamidofos Isofenfos

Los fosfatos orgánicos utilizados como insecticidas, presentan usualmente dos radicales orgánicos iguales, variando solamente el tercero.

La constitución de los derivados fosfóricos guarda relación con su comportamiento tóxico. En general, la toxicidad de la forma tiono es inferior a la de la forma oxo. Otra diferencia bien establecida es que los derivados metil son menos tóxicos en los mamíferos que los etil, cuando se comparan compuestos de similar estructura.

Así, pues, puede establecerse una gradación en la toxicidad de los derivados fosfóricos, dependiendo de sus sustituyentes:

1. Introducción

Tionofosfatos < Fosfatos

Metilderivados < Etilderivados

Esta cualidad tiene una gran importancia en la selección de los distintos derivados que se pueden emplear como insecticidas, y por ello no debe extrañarnos la cantidad existente de derivados tiono y tionotiol y el gran empleo que se hace de las formas metil con preferencia a otras estructuras, ya que las mencionadas parecen asegurar la menor toxicidad del producto frente a los animales superiores.

También puede decirse, como norma general, que los derivados de tipo fosfato se hidrolizan más rápidamente que los tiono y tionotiofosfatos y esto tiene su traducción práctica en la persistencia y efectividad, por lo que normalmente los derivados fosfato poseen más acción de choque (son más rápidos) que los tiono y tionotiofosfatos, pero también son menos persistentes (Barberá, 1989).

Estas características generales se modifican más o menos por la influencia del tercer sustituyente.

La transformación del enlace tiono en la forma biológicamente activa oxo en el cuerpo de los insectos, plantas (caso de los insecticidas sistémicos) y animales, ha sido bien comprobada en muchísimos casos.

1.3.1.1 Metil azinfos

Nomenclatura Química:

O,O-dimetil-S-[4-oxo-1,2,3-benzo-triazin-3-(4H)-il-metil]-ditiofosfato (Figura 1.4)

Clasificación Química: Organofosforado (Tabla 1.3)

Acción: De contacto e ingestión

Uso: Insecticida-Acaricida (Tabla 1.4)

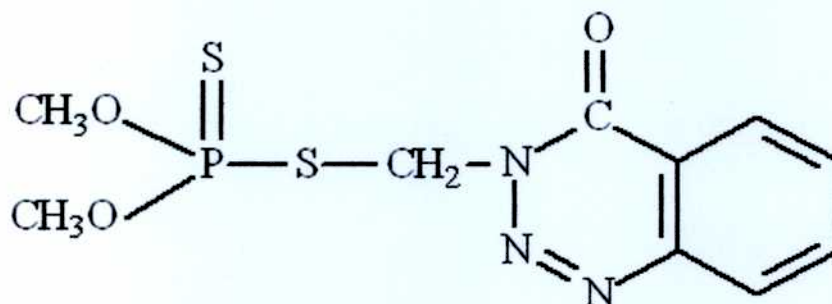


Figura 1.4: Estructura molecular del metil azinfos

1. Introducción

Tabla 1.3: Propiedades físicas y químicas del metil azinfos. Fuente: HSDB (1999)

Número de registro CAS	86-50-0
Descripción	Cristales de color amarillo, sin olor
Fórmula molecular	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$
Peso molecular	$317,32 \text{ g mol}^{-1}$
Densidad	$1,518 \text{ g ml}^{-1}$
Punto de fusión	$73 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Presión de vapor	$7,5 \cdot 10^{-9} \text{ mm Hg (25 }^{\circ}\text{C)}$
Solubilidad	28 mg L^{-1} en agua a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $> 250 \text{ g L}^{-1}$ en dicloroetano, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo y dimetil sulfóxido a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,2 \text{ g L}^{-1}$ en n-heptano y 170 g L^{-1} en xileno a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Constante Ley de Henry	$1,1 \cdot 10^{-7} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1} (25 \text{ }^{\circ}\text{C})$
Log K_{ow}	2,75

Información toxicológica. Fuente: Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 1997

DL₅₀ oral (14 días) para ratas: 10 mg kg^{-1}

DL₅₀ dermal (24 horas) para ratas: 200 mg kg^{-1}

Producto moderadamente tóxico: Categoría II (Formulación polvo seco al 3%)

Producto altamente tóxico: Categoría I (Formulación suspensión al 35%)

1. Introducción

Tabla 1.4: Usos del metil azinfos en la República Argentina. Fuente: Guía de productos fitosanitarios (1997)

Cultivo	Plaga	Dosis PC 3%	Dosis PC 35%	TC ¹	Momento de aplicación
Algodón	Arañuela roja común (<i>Tetranychus telarius</i>)		1300 g/ha	21	Comenzar el tratamiento cuando se observen los primeros ataques de la plaga
	Lagarta rosada (<i>Pectinophora gossypiella</i>)		1500 g/ha		Cuando se observen el 10% de las cápsulas atacadas
	Oruga de la hoja (<i>Alabama argillacea</i>)				Aplicar cuando la infestación sea de cinco orugas promedio por planta
	Trips (<i>Thrips spp.</i>)		1300 g/ha		Comenzar la aplicación cuando en el recuento se tengan más de dos a tres trips por hoja
Áreas cultivadas	Hormiga negra común (<i>Acromyrmex lundii</i>)				Espolvorear las bocas de los hormigueros y los caminos recorridos por las hormigas
Áreas no cultivadas	Hormiga negra común (<i>Acromyrmex lundii</i>)				
Citrus	Cochinilla blanca del tronco (<i>Unaspis citri</i>) cochinilla roja australiana (<i>Aonidiella aurantii</i>)		95-150 g + 0,5 l aceite/hl	20	Iniciar la aplicación al aparecer las ninfas
	Mosca del Mediterráneo (<i>Ceratitis capitata</i>)				Aplicar poco antes que los frutos tomen color. Repetir a los siete días
Florales	Arañuela parda (<i>Bryobia rubrioculus</i>) Arañuela roja común (<i>Tetranychus telarius</i>) Trips (<i>Thrips spp.</i>)	14-18 kg/ha			Iniciar los tratamientos cuando se observen los primeros ataques de la plaga
Frutales de carozo	Gusano del brote de duraznero (<i>Grapholita molesta</i>)		85-100 g/hl	20	Aplicar según los servicios de alarma y/o al observar la caída de mariposas en las trampas. Aplicar a más tardar al observar los primeros daños. No aplicar en época de floración
Frutales de pepita	Bicho de cesto (<i>Oiketicus platenses</i>) Gusano de la pera y la manzana (<i>Carpocapsa pomonella</i>) Psílido del peral (<i>Psylla pyricola</i>)		85-100 g/hl	38	Aplicar según los servicios de alarma y/o al observar la caída de mariposas en las trampas. Aplicar a más tardar al observar los primeros daños. No aplicar en época de floración.

¹ TC: Tiempo de carencia. Se indica cuantos días como mínimo, antes de la cosecha o pastoreo, se deben suspender los tratamientos con el producto fitosanitario, de fundamental importancia para que los residuos del mismo se encuentran dentro de los límites aceptables, ya sea para el consumo humano o animal.

1. Introducción

Hortalizas	Bicho moro (<i>Epicauta adpersa</i>)	14-18 kg/ha		25	Iniciar los tratamientos cuando se observen los primeros ataques de la plaga
	Chinche del zapallo (<i>Anasa guttifera</i>)	14-16 kg/ha			
	Chinche verde (<i>Nezara viridula</i>)		900-1300 g/ha		
	Chinche verde (<i>Nezara viridula</i>)	14-16 kg/ha			
	Cotorrita (<i>Empoasca fabae</i>)		900-1300 g/ha		
	Cotorrita (<i>Empoasca fabae</i>)	14-18 kg/ha			
	Gorgojo de la alfalfa (<i>Naupactus leucoloma</i>)	20 kg/ha			
	Gorgojo del tomate (<i>Phydenus muriceus</i>)	14-18 kg/ha			
	Polilla de la papa (<i>Gnorimoschema operculella</i>)	20 kg/ha			
	Trips (<i>Thrips spp.</i>)	14-18 kg/ha			
Nogal	Gusano de la pera y la manzana (<i>Carpocapsa pomonella</i>)		85-100 g/hl	20	Aplicar según los servicios de alarma y/o al observar la caída de mariposas en las trampas. Aplicar a más tardar al observar los primeros daños. No aplicar en época de floración
Papa	Bicho moro (<i>Epicauta adpersa</i>) Gorgojo de la alfalfa (<i>Naupactus leucoloma</i>) Polilla de la papa (<i>Gnorimoschema operculella</i>)		900-1300 g/ha	7	Aplicar el producto, al observar los primeros ataques de la plaga
Tabaco	Gusanos minadores (<i>Agromyza spp.</i>)	10-16 kg/ha		15	Iniciar el tratamiento al observarse los primeros ataques
	Polilla de la papa (<i>Gnorimoschema operculella</i>) Pulguilla (<i>Epitrix argentinensis</i>)		930-1400 g/ha		Aplicar cuando se observe la presencia de la plaga
	Pulguilla (<i>Epitrix argentinensis</i>)	10-16 kg/ha			Iniciar el tratamiento al observarse los primeros ataques
Tomate	Gorgojo del tomate (<i>Phydenus muriceus</i>)		1300 g/ha	25	Iniciar los tratamientos al observarse el ataque de la plaga

El metil azinfos es un insecticida-acaricida de contacto e ingestión para el control de plagas en cultivos bajos y frutales. Es usado también contra hormigas podadoras (*Acromyrmex spp.*). El producto es compatible con insecticidas y fungicidas neutros. No debe usarse juntamente con productos fuertemente alcalinos, tales como el caldo bordelés o el polisulfuro de calcio, pues se degrada rápidamente por hidrólisis alcalina.

1.3.1.2 Destino en el ambiente

El metil azinfos es ligeramente persistente. Este pesticida es eliminado de la atmósfera por reacciones con radicales libres (vida media de tres horas) y por precipitación húmeda y seca, cuando se encuentra en la fase de vapor y en la fase particulada, respectivamente. Se une fuertemente a las partículas del suelo, por eso es relativamente poco móvil y su capacidad de lixiviarse hasta las aguas subterráneas es limitada, salvo que la napa freática esté cercana a la superficie del suelo. En este sentido, Loewy y col. (1999) estudiaron la presencia de plaguicidas en las aguas subterráneas del valle del río Neuquén. Estos autores observaron que el compuesto con mayor impacto sobre el agua subterránea era el metil azinfos. Este insecticida organofosforado es aplicado principalmente en la región para el tratamiento de *Carpocapsa pomonella*, una de las plagas más críticas en la producción de manzana, y resultó ser el pesticida más frecuentemente detectado en el agua subterránea durante el período de octubre a marzo con una concentración promedio de $3,22 \mu\text{g L}^{-1}$ (Loewy y col., 1999; Ferrari y col., 2007). Las determinaciones de metil azinfos efectuadas en estudios a campo en otros países, en aguas superficiales adyacentes a zonas cultivadas, oscilan entre $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ y $420 \mu\text{g L}^{-1}$ (Klosterhaus y col., 2003). Esto sugiere la posibilidad de una significativa mortalidad de poblaciones de peces y de invertebrados posteriores a una fuerte lluvia en estos sistemas en estudio. En Argentina, la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, estableció en 2003, con carácter interino, el nivel guía de calidad para metil azinfos a los efectos de protección de la biota acuática (NGPBA), referido a la muestra de agua sin filtrar en un valor menor o igual a $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$.

La biodegradación y volatilización son las rutas primarias de eliminación del metil azinfos del suelo. Asimismo, puede ser removido por hidrólisis y fotólisis, sobre todo en suelos con alto contenido de humedad. En los cuerpos de agua la degradación microbiana y fotolítica es también uno de los principales procesos de remoción. La hidrólisis es relevante en aguas alcalinas, con pH mayor de 11, y los productos que se forman en esta reacción incluyen al ácido antranílico y benzamida, entre otros. Este compuesto muestra una tendencia media a baja a adsorberse a los sedimentos y sólidos suspendidos. En general su persistencia es baja en condiciones ambientales, en el suelo varía de 5 a 18 días (Kralj y col., 2006; Ménager y col., 2007).

La fotodegradación del metil azinfos conlleva a la desaparición del compuesto siguiendo una curva de degradación de primer orden (Kralj y col., 2006). Este proceso

1. Introducción

involucra la disociación de las uniones C-S y N-C. Los productos triazínicos formados (Figura 1.5), son contaminantes conocidos presentes en el ambiente debido a su uso como herbicidas (Ménager y col. 2007).

La fotodescomposición del metil azinfos ocurre eficientemente en suelos y sobre la superficie de las hojas. La tasa de desaparición aumenta con el incremento de humedad del suelo.

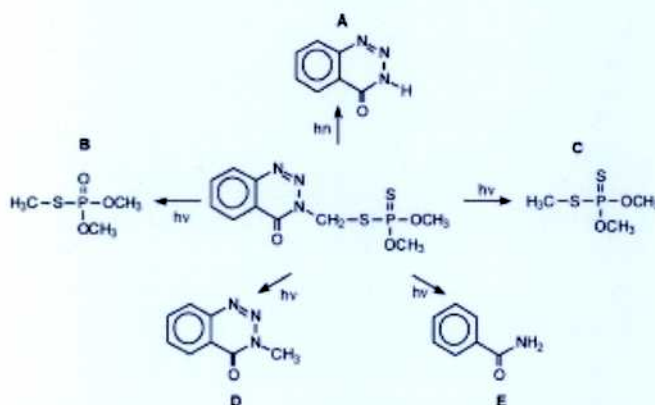


Figura 1.5: Productos de fotodegradación del metil azinfos: 1,2,3-benzotriazina-4(3H)-ona (A), fosforotioato de O,O,S-trimetilo (B), fosforoditioato de O,O,S-trimetilo (C), 1,2,3-benzotriazina-3-metil-4-ona (D), benzamida (E). Fuente: Ménager y col., 2007

Cabe señalar que el oxón derivado proveniente de un proceso oxidativo del metil azinfos no fue detectado bajo el estímulo de la acción de la luz ultravioleta. Tales reacciones oxidativas fueron observadas con otros compuestos organofosforados. La falta en la detección del metil azinfos oxón es muy probable debido a su eficiente fotodegradación.

Muchos pesticidas organofosforados, tal es el caso del metil azinfos, requieren bioactivación del análogo sulfurado por la forma oxón para ejercer su principal acción tóxica, es decir, la inhibición de la enzima AChE. La reacción de desulfuración es mediada por el sistema de monooxigenasa del citocromo P450, uno de los principales sistemas enzimáticos de detoxificación de xenobióticos y también de moléculas endógenas, que en ciertos casos conduce a bioactivación, tal es el caso del metil azinfos oxón.

1.4 Toxicodinamia de los agentes anticolinesterásicos

1.4.1 Estructura y actividad de la acetilcolinesterasa (AChE)

La enzima AChE suprime la acción del neurotransmisor acetilcolina en las uniones de diversas terminaciones nerviosas colinérgicas con sus órganos efectores o en los sitios postsinápticos.

Las sustancias que inhiben a la AChE se denominan agentes anticolinesterásicos, tal es el caso de los insecticidas organofosforados. Hacen que se acumule acetilcolina en la vecindad de terminales nerviosas colinérgicas y, por tanto, pueden producir efectos equivalentes a la estimulación excesiva de los receptores colinérgicos a lo largo del sistema nervioso. En vista de la distribución generalizada de las neuronas colinérgicas, no es de extrañar que los agentes anticolinesterásicos hayan recibido, como grupo, aplicación extensa como agentes tóxicos, en la forma de insecticidas agrícolas y de “gases nerviosos” en la guerra química.

Para hidrolizar la acetilcolina en el espacio extracelular, las colinesterasas necesitan ser expuestas sobre la cara externa de la membrana plasmática o exportadas desde las células: ellas son sintetizadas en el retículo endoplasmático, procesadas, transportadas a través de la vía secretora, y orientadas hasta alcanzar su destino final. El primer producto de traducción contiene una señal secretoria N-terminal, la cual es clivada en la proteína madura. Esta señal N-terminal es seguida por el dominio catalítico, el cual representa la mayor parte de la proteína, unos 500 residuos, y por una pequeña región C-terminal. Varios exones codifican distintos tipos de regiones C-terminal y sus procesamientos alternativos definen los tipos de formas moleculares que pueden ser producidos durante el procesamiento (Figura 1.6). Las múltiples formas moleculares, difieren en su estructura cuaternaria y modo de anclaje y pueden ser producidas a partir de un único gen por procesamiento alternativo y maduración post-traducciona (Masoulié y col., 1999).

1. Introducción

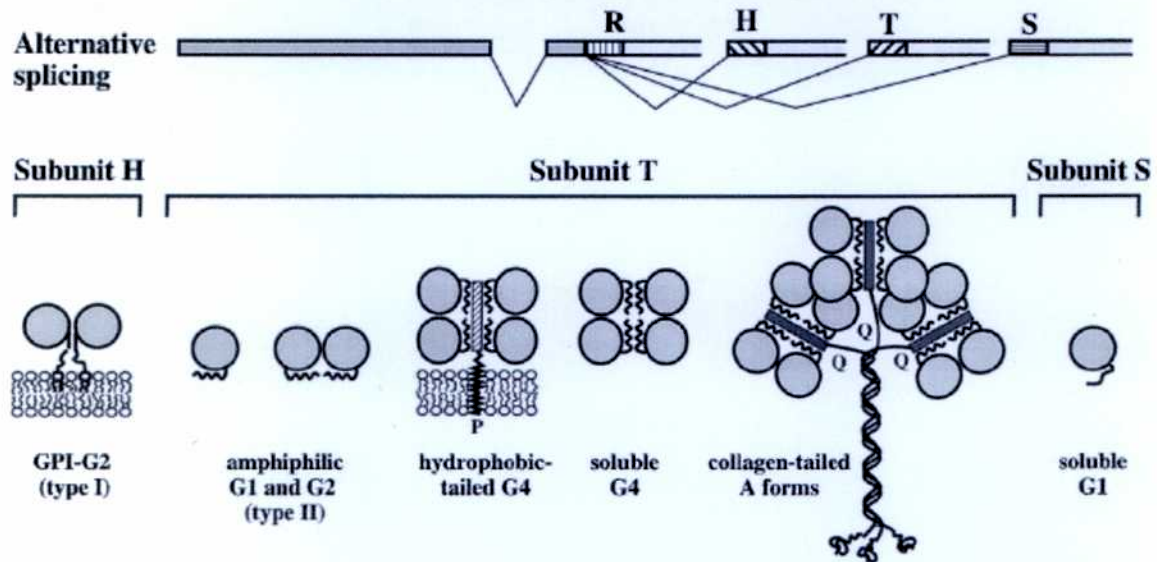


Figura 1.6: Procesamiento alternativo y formas moleculares de acetilcolinesterasa. Los sitios de procesamiento correspondientes a los exones que codifican el dominio catalítico no se muestran porque su número y posiciones varían con las especies. Fuente: Masoulié y col., 1999

Así, la multiplicidad de genes, y los eventos de procesamiento alternativo y post-traduccionales pueden producir una variedad de especies de colinesterasas, pero la importancia de cada uno de estos mecanismos es bastante variable. Por ejemplo, *Drosophila* posee un único gen que codifica para una colinesterasa, clasificada como una AChE, la cual genera un solo tipo de secuencia sin procesamiento alternativo. En contraste, ciertos nematodos (*Caenorhabditis elegans* y *Caenorhabditis briggsae*) poseen cuatro genes para colinesterasas. Cada uno de estos genes genera un transcrito simple, pero las enzimas resultantes varían ampliamente en sus propiedades catalíticas y de anclaje: mientras los productos de los genes ace-1 y ace-2 son sensibles al inhibidor clásico de las colinesterasas, la eserina, los productos de ace-3 y ace-4 son muy resistentes a este carbamato. Estos genes también difieren por su región C-terminal. El cefalocordado anfioxo posee dos genes que codifican para colinesterasas, y producen transcritos del tipo H. Estos genes probablemente resultaron de una duplicación diferencial que dio origen a los genes de la AChE y la BChE presente en los vertebrados, dado que en los agnatos o “peces sin mandíbula”, que representan a la mayoría de los vertebrados primitivos existentes, parecen poseer un solo gen que codifica para colinesterasa (Vellom y col., 1993; Masoulié y col., 1999).

En los vertebrados, las enzimas AChE y BChE son caracterizadas de acuerdo a su especificidad por sustratos e inhibidores. Esta diferencia es actualmente comprendida

1. Introducción

en términos de la organización del dominio catalítico: el espacio disponible en el “saco acilo” permite a la BChE acomodar a la molécula de butirilcolina en su sitio activo, mientras que esto es poco probable en el caso de la AChE.

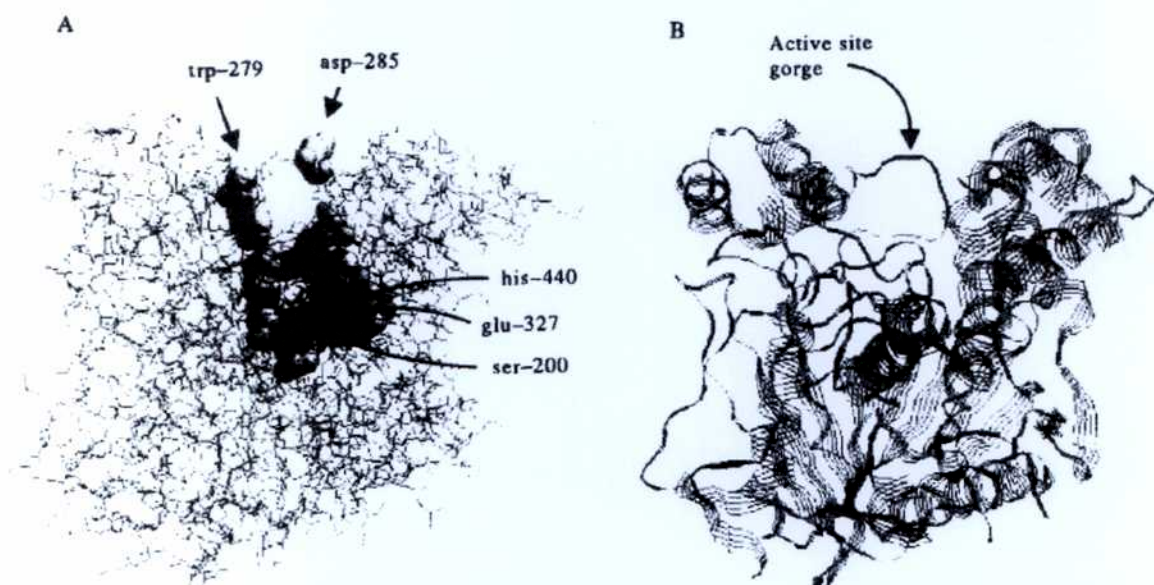


Figura 1.7: Estructura tridimensional de la AChE de *Torpedo californica* determinada por cristalografía de rayos X (Sussman y col., 1991). En la figura A, los residuos que revisten la garganta del sitio activo se muestran en un modelo con relleno. Los tres residuos de la tríada catalítica (Ser-200, Glu-327 y His-440) se observan en la parte inferior de la garganta. En B se observa la estructura globular con dos hélices α y la hoja β -plegada

La estructura tridimensional de la AChE presenta un centro activo que es casi centrosimétrico en relación con cada subunidad, que reside en la base de una garganta estrecha de cerca de 20 Å de profundidad (Figura 1.7). En la base de esta garganta se encuentran los residuos de la tríada catalítica: serina, histidina y glutamato. El mecanismo catalítico es similar al de otras hidrolasas, en las cuales el grupo hidroxilo de la serina se vuelve muy nucleófilo, por medio de un sistema de relevo de carga que abarca al grupo carboxilglutamato, al imidazol que hay en la histidina y al hidroxilo de la serina (Sussman y col., 1991).

Durante el ataque enzimático frente al sustrato acetilcolina, un éster con geometría trigonal, se forma un intermediario tetraédrico entre la enzima y el sustrato, hasta formar un conjugado enzimático acetilo con liberación concomitante de colina. El grupo acetilo es lábil a la hidrólisis, y ésta da por resultado la formación de acetato y enzima activa (Taylor, 2003).

1. Introducción

Tres dominios definidos sobre la AChE constituyen sitios de fijación para ligandos inhibidores (Tabla 1.5) y fundamentan las diferencias de especificidad entre la AChE y la BChE: el saco acilo del centro activo, el subsitio de la colina sobre el centro activo y el sitio aniónico periférico.

El saco acilo en la AChE es descrito por las cadenas laterales de dos fenilalaninas en la enzima de mamíferos, F₂₉₅ y F₂₉₇; en la BChE los residuos correspondientes a las posiciones anteriores son de leucina e isoleucina, los cuales ocupan un volumen mucho menor. La sustitución de leucina por fenilalanina en la posición 295 proporciona una reducción suficiente del volumen que permite a la butirilcolina ser un sustrato eficiente, mientras que la sustitución de isoleucina o valina por fenilalanina en la posición 297 cambia el perfil cinético de la enzima mostrando una inhibición por sustrato y la otra activación. La inhibición por sustrato es característica de AChE, mientras que la activación por sustrato es característica de la BChE (Taylor y col., 1995).

Tabla 1.5: Dominios de la colinesterasa afectados por ligandos específicos. Fuente: Taylor y col., 1995

	Sustrato	Inhibidores selectivos	Preferencia AChE / BChE	Residuos AChE ^a
1. Saco Acilo (centro activo)	Dimensiones críticas del grupo acilo influencia la inhibición por sustrato	Iso-OMPA	BChE	Fenilalanina-F ₂₉₅₍₂₈₈₎ Fenilalanina-F ₂₉₇₍₂₉₀₎
2. Subsitio Colina (centro activo)	Especificidad por ésteres neutros Versus ésteres catiónicos	Etopropazina Huperzina	BChE AChE	Tirosina-Y ₃₃₇₍₃₃₀₎ Tryptofano-W ₈₆₍₈₄₎ ^b Glutamato-E ₂₀₂₍₁₉₉₎ ^b
3. Borde de la garganta (sitio periférico)	Pobre influencia directa Sólo alostérica	Fasciculina Propidio	AChE AChE	Tirosina-Y ₇₂₍₇₀₎ Tirosina-Y ₁₂₄₍₁₂₁₎ Tryptofano-W ₂₈₆₍₂₇₉₎
4. Borde de la garganta y subsitio de colina	Similar a 2 y 3	BW284c51	AChE	Aspartato-D ₇₄₍₇₂₎ ^b Residuos en dominios 2 y 3

^a El primer subíndice corresponde al sistema de numeración para la AChE de los mamíferos; el número entre paréntesis corresponde al sistema de numeración de *Torpedo*

^b Residuos conservados en AChE y BChE

1.4.2 Características de las sustancias que afectan a la AChE

Las dos principales clases de insecticidas colinérgicos, compuestos organofosforados y carbamatos, difieren fundamentalmente en sus propiedades inhibitorias sobre la AChE. Los compuestos organofosforados son considerados funcionalmente inhibidores irreversibles de la AChE dado que el tiempo necesario para liberar a la enzima de la inhibición puede ser por mucho el tiempo requerido para nueva síntesis de enzima. Los carbamatos pueden tener una rápida decarbamoilación y así la recuperación de la enzima puede ocurrir dentro de las 24-48 horas. Estas diferencias entre los efectos de estos dos tipos de pesticidas deben ser tenidas en cuenta al momento de hacer diagnósticos de muestras obtenidas a campo, en donde una sospecha de contaminación por carbamatos necesita ser analizada dentro de las 24 horas del impacto inicial (Abdullah y col., 1994).

1.4.3 Reactivación química de la AChE inhibida

La reactivación química es una forma de confirmar si actividades bajas de AChE se deben a inhibición por pesticidas. La reactivación de la enzima es producida por adición de piridina-2-aldoxima (2-PAM), la cual producirá una sustancial recuperación de la actividad en aquellos casos donde ha sido inhibida por pesticidas organofosforados (Martin y col., 1981). Los resultados obtenidos por la aplicación de esta técnica pueden ser sesgados por los pesticidas involucrados, dado que es conocido que los compuestos organofosforados dimetil-sustituídos son menos propensos a la reactivación por 2-PAM que los compuestos dietil-sustituídos. La velocidad de reactivación de AChE fosforilada por 2-PAM varía según la naturaleza del grupo fosforilo y en general sigue la misma secuencia que el orden de reactivación hidrolítica espontánea, es decir, dimetilfosforil-AChE > dietilfosforil-AChE > diisopropilfosforil-AChE. Además, la AChE fosforilada puede sufrir un proceso bastante rápido de “envejecimiento”, de modo que en minutos u horas se hace completamente resistente a los reactivadores. El “envejecimiento” se debe probablemente a la pérdida de un grupo alquil o alcoxi, dejando una monoalquil o monoalcoxi-fosforil-AChE mucho más estable (Fleisher y Harris, 1965).

1.4.4 Caracterización de las colinesterasas en invertebrados

Dado que la inhibición de la AChE es sustancialmente irreversible para los insecticidas organofosforados, el porcentaje de inhibición en la actividad de la AChE puede ser usado como un biomarcador de exposición de un organismo a pesticidas

1. Introducción

organofosforados por un período considerable de tiempo posterior a que el contaminante mismo haya sido eliminado del organismo. El monitoreo de la actividad AChE en los cerebros de peces y aves en el campo se ha vuelto una técnica comúnmente usada para diagnosticar su exposición a venenos colinérgicos (Greig-Smith, 1991; Zinkl y col., 1991).

Aunque los invertebrados acuáticos son usados rutinariamente como indicadores biológicos, el uso de la inhibición de la AChE como un marcador bioquímico en estas especies ha sido poco investigado. Los invertebrados acuáticos, en general, son más sensibles a los insecticidas organofosforados que los vertebrados (Giesy y col., 1999). Aunque las AChEs de vertebrados son primariamente enzimas ligadas a las membranas, existen numerosas evidencias que indican que la AChE de invertebrados se presenta en forma hidrofílica (buffer-soluble) y anfifílica (unida a membrana). Esto fue reportado en coleópteros, lepidópteros, dípteros, himenópteros, y otros animales acuáticos (Casida, 1955; Belzunces y col., 1988; Edwards y Fisher, 1991; Jensen y col., 1997; Bendahou y col., 1999; Rickwood y Galloway, 2004).

Además de la actividad AChE que varía en sus formas y localización, la magnitud de su actividad en un tejido dado puede también variar en respuesta a características del organismo tales como el estado de desarrollo y la edad.

Dado que las propiedades de las colinesterasas (ChEs) pueden diferir entre las especies, es importante caracterizar el tipo de enzima presente en las especies antes de ser usada como biomarcador. Además, más de una colinesterasa puede estar presente y las mismas pueden mostrar diferentes sensibilidades a los agentes anticolinesterásicos (Kristoff y col., 2006). En este sentido, Bocquené y col. (1997) describieron la presencia de dos colinesterasas en la ostra común, una insensible a los organofosforados y carbamatos, unida a la membrana y que hidroliza AsCh pero no BsCh, y la otra, hidrofílica y altamente sensible a organofosforados y carbamatos que hidroliza a la AsCh y en mucho menor proporción a la BsCh. Mora y col. (1999) también describieron una colinesterasa que era pobremente inhibida por organofosforados en mejillones marinos y en un bivalvo de agua dulce. Además, Basack y col. (1998) describieron dos actividades de colinesterasa en *Corbicula fluminea*, una presente en el pellet obtenido a una centrifugación de 10.000 x g, que comparte todas las características de la AChE de los vertebrados, y otra localizada en el sobrenadante relativamente insensible a la eserina.

1. Introducción

1.4.4.1 Caracterización de las colinesterasas en *B. glabrata* y *L. variegatus*

Las mediciones de la actividad ChE a partir de homogenatos de los tejidos corporales blandos de *B. glabrata* y *L. variegatus* fueron realizadas por Kristoff y col. (2006) usando dos sustratos: acetiltiocolina (AsCh) y butiriltiocolina (BsCh). El uso de AsCh permite la determinación de la actividad ChE total, mientras que el uso de BsCh refleja más acertadamente la actividad BChE. La actividad fue determinada en el sobrenadante o en el pellet obtenido después de centrifugado. Los resultados se muestran en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6: Actividad ChE en los sobrenadantes y pellets de los tejidos corporales blandos de *B. glabrata* y *L. variegatus*. Fuente: Kristoff y col., 2006

Sustrato	Actividad ChE ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)			
	<i>B. glabrata</i>		<i>L. variegatus</i>	
	Sobrenadante	Pellet	Sobrenadante	Pellet
AsCh	$0,046 \pm 0,006$	$0,013 \pm 0,006$	$0,320 \pm 0,039$	$0,276 \pm 0,087$
BsCh	$0,003 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	$0,266 \pm 0,020$	$0,230 \pm 0,020$
AsCh/BsCh	15,33	2,60	1,20	1,20

Como era de esperar, la mayor actividad enzimática se observó utilizando AsCh tanto en el sobrenadante como en el pellet de ambos invertebrados. En el molusco gastrópodo *B. glabrata* casi toda la actividad se observó cuando se usó AsCh como sustrato y estaba principalmente localizada en la fracción sobrenadante. En cambio, muy bajos niveles de actividad se detectaron cuando se utilizó BsCh, tanto en el sobrenadante como en el pellet. El oligoqueto presentó valores más altos de actividad enzimática con relación a *B. glabrata*, independientemente del sustrato ensayado. Además, valores comparables de actividad se detectaron con los dos sustratos tanto en la fracción sobrenadante como en el pellet.

La ChE proveniente de los sobrenadantes de *B. glabrata* no se inhibió significativamente por el inhibidor de la BChE, iso-OMPA, confirmando los bajos valores de actividad observados cuando se ensayó con el sustrato BsCh. Por otro lado, el iso-OMPA indujo una inhibición significativa de la actividad colinesterasa en los sobrenadantes de *L. variegatus*.

1.5 Algunas características de los invertebrados utilizados

1.5.1 *Biomphalaria glabrata*

Ubicación taxonómica

Phylum: Mollusca

Clase: Gastropoda

Subclase: Pulmonata

Orden: Basommatophora

Familia: Planorbidae

Género y especie: *Biomphalaria glabrata*



Figura 1.8: *Biomphalaria glabrata*, ejemplar adulto pigmentado

1.5.1.1 Hábitat y distribución geográfica

Biomphalaria glabrata es un gastrópodo pulmonado que vive en aguas dulceacuícolas tropicales, principalmente en canales, valles de irrigación y en pequeños cursos de agua. Puede colonizar grandes ríos y lagunas, pero la escorrentía y las pequeñas ondas formadas por el viento dificultan su vida en estos lugares (Ruppert y Barnes, 1994). Se distribuye en América del Sur y América Central. Actualmente está presente en extensas áreas de Brasil, en el sudeste de Bahía, norte de Espírito Santo y centro-este de Minas Gerais. Aparece en menor número en zonas cálidas y húmedas de Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Maranhão, Pará, Goriás, Rio de Janeiro, São Paulo y Paraná. También se encuentra en el norte Argentino

(Carvalho y col., 2001). Recientemente fue introducido en algunas zonas de los Estados Unidos.

1.5.1.2 Algunas características biológicas

Este caracol tiene tres zonas corporales diferentes: una céfalo-pedal, que contiene los órganos sensoriales y los motores; una masa visceral, donde están alojados los órganos de la digestión, excreción y reproducción, y el manto, por encima de la masa visceral (Figura 1.8). Son asimétricos debido al fenómeno de torsión (giro de 180° del resto del cuerpo con respecto al eje céfalo-pedal); la concha calcárea, en espiral en un plano, mide 3 a 4 cm de diámetro y presenta una depresión central en cada faz. El caparazón crece con el cuerpo y sólo son visibles fuera de éste la cabeza y el pie, su abertura es proporcional al tamaño de su cuerpo, su diámetro varía con las condiciones ambientales. La formación de la concha comienza en el embrión (Figura 1.9).

En las poblaciones se distinguen organismos pigmentados y no pigmentados, de acuerdo a la presencia o ausencia de pigmentos melánicos o similares.

La cabeza está bien desarrollada, con un par de tentáculos simples conteniendo ojos cerca de sus bases. Estos apéndices son importantes como quimiorreceptores. La boca exhibe una rádula provista de dientes.

Por ser un gastrópodo pulmonado, la cavidad del manto está modificada como un saco respiratorio, altamente vascularizado en la región anterior, donde tiene lugar el intercambio gaseoso, funcionando como un pulmón.

La actividad del animal está relacionada con el desarrollo de los órganos sensoriales cefálicos. El pie, en donde se encuentran los órganos motores, le permite desplazarse en todas las direcciones. Otra importante función del pie es la secreción de moco.

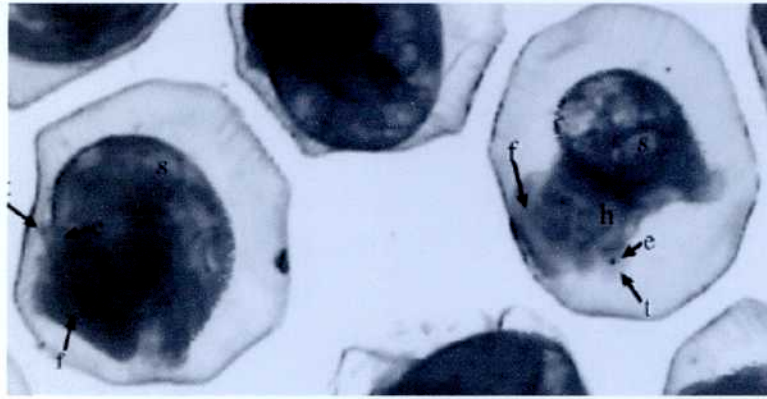


Figura 1.9: *B. glabrata*, detalle del embrión: h: cabeza, f: pie; s: caparazón; e: ojo; t: tentáculo. Fuente: Nakano y col., 2003

Se trata de un gastrópodo hermafrodita que presenta con frecuencia reproducción cruzada. Los huevos son puestos en una especie de cápsula que puede contener, en condiciones de laboratorio, de 20 a 50 huevos. Su reproducción es menor durante el invierno (Monteiro y Dias, 1989).

Es un caracol herbívoro. En el ambiente natural se alimenta de algas finas de agua dulce y de las partes más blandas de las plantas vasculares acuáticas. Es relativamente fácil de adaptar y mantener en condiciones de laboratorio.

B. glabrata es uno de los gastrópodos más estudiados por ser huésped intermediario del parásito *Schistosoma mansoni*, que produce en el ser humano la enfermedad denominada esquistosomiasis.

Además, este gastrópodo ha sido utilizado como bioindicador en ensayos de toxicidad aguda y subaguda para la evaluación de riesgos ambientales por metales y por plaguicidas (Münzinger, 1987; Verrengia Guerrero y col., 1997, 2000; Abd Allah y col., 2003). Los moluscos de agua dulce del género *Biomphalaria* pueden ser considerados buenos indicadores para el monitoreo biológico. El género muestra una amplia distribución geográfica y son de fácil recolección. Otros aspectos hacen de este sistema un buen modelo para estudios de laboratorio. Los caracoles son fáciles de criar, requieren poco espacio, pueden reproducirse a lo largo del año en virtud de las condiciones controladas. Un monitoreo de “huevo a huevo” puede ser hecho en dos meses en *B. glabrata*. Al ser hermafrodita, las reacciones diferenciales que se producen en ambos sexos no ocurren. Los embriones también constituyen un buen sistema de estudio. Los caracoles adultos colocan las masas gelatinosas con sus huevos casi a diario. Todo el desarrollo embrionario se produce en aproximadamente 7-9 días a 25 °C.

1. Introducción

Los huevos se colocan uno por uno en una sola capa formando una cápsula ovalada transparente, que permite la visualización de los embriones a lo largo del desarrollo (Nakano y col., 2003).

1.5.2 *Lumbriculus variegatus*

Clasificación y evolución

Phylum: Anelida

Clase: Oligoqueto

Orden: Lumbriculida

Familia: Lumbriculidae

Género y especie: *Lumbriculus variegatus*



Figura 1.10: *Lumbriculus variegatus*

Las relaciones evolutivas entre este grupo y otros anélidos no se conocen bien. Algunos biólogos sugieren que el Orden Lumbriculida puede ser una ramificación temprana de los oligoquetos durante la evolución de los anélidos. Pero estas interpretaciones son complicadas por la variabilidad en el número y localización de las gónadas en Lumbriculidae, una característica común en las lombrices que se reproducen asexualmente por fragmentación.

1.5.2.1 Hábitat, formas de vida y reproducción

El género *Lumbriculus* se encuentra en toda Norte América y Europa. Prefiere habitats someros en los bordes de los estanques, lagos o pantanos donde se alimenta de hojas en descomposición y de microorganismos. Los microhábitats favoritos incluyen capas de hojas en descomposición, troncos sumergidos o los sedimentos en la base de la vegetación emergente.

En la naturaleza, *Lumbriculus* usa su cabeza para buscar alimentos en los sedimentos y escombros, mientras que su cola, especializada para el intercambio de gases, a menudo la proyecta hacia arriba. Cuando le resulta posible, la lombriz extiende verticalmente su cola a la superficie del agua en donde forma un ángulo recto y disminuye la tensión superficial del agua. Esta postura facilita el intercambio gaseoso entre el aire y el vaso sanguíneo dorsal ubicado justo debajo de la epidermis.

Las especies de *Lumbriculus* recolectadas en el campo a menudo son más grandes que las lombrices criadas en el laboratorio. El tamaño máximo puede ser de unos 10 cm de longitud (aproximadamente 200-250 segmentos) y de 1,5 mm de diámetro. Estos especímenes aparecen como sexualmente maduros y hermafroditas (Drewes y Brinkhurst, 1990).

Las lombrices cultivadas en condiciones controladas de laboratorio son usualmente pequeñas (4-6 cm de longitud) comparadas con las que se encuentren en su hábitat natural, y nunca alcanzan la madurez sexual. La reproducción bajo condiciones de laboratorio siempre es por fragmentación asexual, durante la cual una lombriz espontáneamente se divide en dos o más fragmentos. Cada fragmento sobreviviente sufre una rápida regeneración de los segmentos del cuerpo para formar una nueva cabeza, cola, o ambos extremos.

La capacidad de reproducción asexual por fragmentación es tan grande como la habilidad de auto-amputación en respuesta a lesiones u otro tipo de estímulos nocivos. Esta respuesta refleja de protección se denomina autotomía. Otro estímulo que causa en las lombrices una rápida autotomización es la compresión del cuerpo (Lesiuk y Drewes, 1999).

1.5.2.2 Anatomía y fisiología

La distinción de los extremos correspondientes a la cabeza y a la cola en estas lombrices no es difícil porque los segmentos correspondientes a la cabeza están más fuertemente pigmentados, son más amplios y más maniobrables que los segmentos

1. Introducción

correspondientes a la cola. Aunque muchos segmentos posteriores parecen ser muy similares entre ellos, hay diferencias importantes en su estructura y función a lo largo del cuerpo. Estas diferencias son sutiles y graduales, usualmente aparecen como gradientes anteriores o posteriores que afectan a casi todos los órganos y sistemas.

Los músculos en la pared del cuerpo de *Lumbriculus*, así como la mayoría de los oligoquetos, se organizan en dos capas, una circular y otra longitudinal. Estas formas más o menos continuas y cilíndricas de hojas se colocan alrededor de cada segmento corporal. Estas fibras musculares en capas se clasifican como oblicuamente estriadas. Debido a que no hay elementos óseos a los cuales estas fibras musculares se inserten, las fuerzas producidas cuando ellas se contraen simplemente actúan sobre el interior, los compartimientos corporales llenos de fluido, específicamente, la cavidad del celoma y el intestino. El resultado es que los segmentos cambian de forma pero no de volumen, dado que los fluidos no son comprensibles.

Como las lombrices terrestres, la sangre de *Lumbriculus* es roja, debido a un pigmento semejante a la hemoglobina, la eritrocruorina, disuelta en el plasma. La sangre circula en un sistema cerrado de vasos y capilares. Es bombeada por contracciones rítmicas del vaso sanguíneo dorsal, el cual mueve la sangre, segmento por segmento, desde el extremo posterior (el principal sitio de intercambio gaseoso) hacia la cabeza (Lesiuk y Drewes, 1999).

El sistema nervioso central consiste de un ganglio cerebral (supra-esofágico) en el primer segmento y un cordón nervioso ventral que se extiende continuamente a través del cuerpo entero. En un segmento típico, el cordón nervioso ventral tiene cuatro pares de segmentos nerviosos que se extienden lateral y dorsalmente alrededor de la pared del cuerpo. Algunas de las fibras nerviosas de los segmentos son sensoriales y detectan estímulos provenientes de la superficie del cuerpo; otras son fibras motoras que inervan la pared muscular del cuerpo o a células glandulares.

Las estructuras sensoriales en la pared del cuerpo de *Lumbriculus* incluyen células fotorreceptoras simples, neuronas sensoriales que detectan vibraciones, o presión, así como también células quimiosensoriales (Lesiuk y Drewes, 2001).

Frente a una amenaza, se generan respuestas reflejas mediadas por las fibras del nervio gigante situadas dentro del cordón del nervio ventral a lo largo del cuerpo. Estas fibras gigantes funcionan como conductos para una rápida conducción del impulso nervioso que, a su vez, desencadenan la actividad en las neuronas motoras y el músculo longitudinal, lo que conlleva al acortamiento del cuerpo. Lesiuk y Drewes (2001)

1. Introducción

demonstraron que las fibras del nervio gigante en *Lumbriculus* tienen una remarcable capacidad para la rápida restauración de la función del cordón nervioso central posterior a la ablación.

L. variegatus es un oligoqueto de agua dulce que ha sido recomendado y ampliamente adoptado como un organismo estándar para estudios de bioacumulación y ensayos de toxicidad (US EPA, 1994; ASTM, 1995). Este oligoqueto es conocido por ser moderadamente sensible a los xenobióticos (Drewes, 1997). La investigación científica en *L. variegatus* se ha centrado en la toxicocinética y la bioacumulación de sustancias orgánicas y metales (Tabla 1.8). Otros estudios investigan la transferencia de sustancias tóxicas a través de la cadena trófica, pero sólo unos pocos se llevaron a cabo para conseguir más información sobre las respuestas enzimáticas o fisiológicas de este organismo, cuando fueron expuestos a *poluentes* de origen antropogénico (Contardo-Jara y Wiegand, 2008).

1. Introducción

Tabla 1.8: Resumen de los parámetros monitoreados y efectos de los estudios toxicológicos seleccionados con *L. variegatus*. Fuente: Contardo-Jara y Wiegand, 2008

Parámetro monitoreado	Contaminante aplicado
Toxicocinéticos: bioacumulación, depuración, carga corporal de sustancias orgánicas y metales	Pireno dosado en sedimento Cobre, Cadmio Pireno, benzo[a]pireno Ioxinil, pendimetalin, bentazone Fluoranteno Bifenilos policlorados Hidrocarburos poliaromáticos Difenileteres polibromados Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina 4-Nonilfenol, alquilbenceno sulfonatos
Toxicidad aguda: Mortalidad, crecimiento, regeneración, reproducción	Pireno dosado en sedimento Cobre, cadmio Terbutrin Ivermectina Fluoranteno Ioxinil, pendimetalin, bentazone 2,4,5-Triclorofenol, pentaclorofenol Carbamacepina Fluoxetina
Conducta: Tasa de alimentación, locomoción	Pireno Pireno, benzo[a]pireno Ivermectina Fluoranteno Bifenilos policlorados
Transferencia en la cadena trófica de sustancias tóxicas	Benzo[a]pireno, tetraclorobifenilo (PCB 52) Metales 4-Nonilfenol
Respuestas enzimáticas/fisiológicas: GST, CAT, P-450, ALA-D, ChE	Insecticidas organofosforados 2,4-Dinitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,5-Triclorofenol Plomo Paraquat, materia orgánica disuelta

1.6 Objetivos

El objetivo general del presente trabajo consistió en investigar algunos aspectos relacionados con la toxicocinética y la toxicodinámica del metil azinfos en *L. variegatus* y *B. glabrata*. Por consiguiente, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- ✓ Desarrollar y validar un método por cromatografía líquida de alta performance para cuantificar, tanto en medio acuoso como en muestras de tejidos biológicos, al insecticida metil azinfos, utilizando un detector UV-Visible
- ✓ Determinar la estabilidad temporal del metil azinfos durante las condiciones experimentales de los bioensayos
- ✓ Determinar la concentración de metil azinfos en tejidos de organismos expuestos
- ✓ Evaluar y comparar la capacidad de bioconcentración en las dos especies seleccionadas
- ✓ Desarrollar un modelo cinético de bioconcentración frente a distintos tiempos de exposición de los dos invertebrados a concentraciones conocidas del insecticida
- ✓ Desarrollar un modelo cinético de eliminación del insecticida, luego de la exposición a concentraciones conocidas, en función del tiempo
- ✓ Determinar el grado de la inhibición *in vitro* de las colinesterasas a partir de los homogenatos de ambas especies por el pesticida metil azinfos y su oxo-derivado. Comparar los resultados con los observados mediante estudios *in vivo*
- ✓ Relacionar los modelos cinéticos con los resultados experimentales obtenidos previamente en los ensayos de caracterización e inhibición de las colinesterasas por el insecticida organofosforado

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos

El estándar analítico de metil azinfos Pestanal®, pureza >98%, y el metil azinfos oxón Supelco®, lote 381-3B, con 100 µg ml⁻¹ de tolueno, ampolla de 5 ml, se compraron a Sigma Aldrich de Argentina S.A.

El agua y el acetonitrilo, calidad HPLC, se adquirieron a Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina).

Los reactivos, ioduro de acetiltiocolina (AsCh) y 5,5'-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB), se obtuvieron de Sigma Aldrich de Argentina S.A.

Los otros reactivos utilizados en el trabajo fueron de grado analítico, marca Carlo Erba, Mallinckrodt o Merck.

2.1.2 Equipos

Los homogenatos de ambas especies de invertebrados se prepararon usando un Potter Elvehjen con émbolo de teflón.

Las cuantificaciones de metil azinfos y del oxón derivado se efectuaron en un cromatógrafo líquido de alta performance, Class-VP Shimadzu, con columna de fase reversa C18, Supelcosil LC 18, 5 µm, con dimensiones de 25 cm por 4,6 mm, número de columna 90159-06 y guarda columna Supelguard LC-18 de 2 cm, lote 6136, Supelco®, bomba de flujo isocrático, detector UV-visible, perteneciente al Laboratorio de Control de Calidad, Servicio de Farmacia, Hospital Nacional Prof. Dr. Alejandro Posadas.

Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A doble haz.

2.1.3 Organismos seleccionados

El oligoqueto acuático, *L. variegatus*, fue inicialmente obtenido de los cultivos del Prof. K. Simkiss, Universidad de Reading, Reino Unido. Una vez en el laboratorio, los organismos se cultivaron en peceras de plástico de 12 litros, con aireación, y conteniendo trozos de toallas de papel (formando un lecho de 3 a 6 cm) en unos 8 litros de agua declorada. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C y con un fotoperíodo artificial de 16-8 horas de luz/oscuridad. Los organismos se alimentaron

2. Materiales y Métodos

con alimento para peces (TetraFin®, TetraWerke, Alemania) tres veces por semana. Para todos los bioensayos se utilizaron organismos adultos de $2,5 \pm 0,5$ cm de largo.

Los cultivos de los moluscos gastrópodos de *B. glabrata* fueron obtenidos inicialmente del Laboratorio de Invertebrados, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los organismos fueron luego cultivados en nuestros laboratorios en peceras de vidrio aireadas (17 a 20 litros), a una temperatura de 24 ± 2 °C y con un fotoperíodo artificial de 14-10 horas de luz/oscuridad. Los animales se alimentaron con hojas de lechuga *ad libitum* (Fried y col., 1992). En todos los experimentos, fueron empleados organismos adultos de tamaño similar (18 ± 2 mm de diámetro).

Para los cultivos se utilizó agua de red, declorada por al menos 24 horas, con las siguientes propiedades físico-químicas: dureza total = 67 ± 3 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$; alcalinidad = 29 ± 2 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$; pH = $7,0 \pm 0,2$; y conductividad = 250 ± 17 μS . Para los bioensayos el agua declorada fue filtrada por una columna de carbón, a fin de eliminar la materia orgánica que pudiera estar disuelta.

2.2 Métodos

2.2.1 Separación y cuantificación del metil azinfos y del metil azinfos oxón

La separación y cuantificación del metil azinfos en muestras de agua y en el material biológico se realizó por HPLC, fase reversa. Igual procedimiento se utilizó para cuantificar las diluciones del metil azinfos oxón en la fase móvil.

Las corridas se desarrollaron en todos los casos a una temperatura del horno de 40 °C. La columna se equilibró con una fase móvil compuesta por acetonitrilo-agua (45:55 V/V) previamente a la inyección de la muestra. El flujo de la corrida fue de 1 ml min^{-1} y la detección se realizó con un detector UV-Visible a 220 nm. La curva de calibración se efectuó con un estándar de metil azinfos disuelto en acetonitrilo y a una concentración de $540 \mu\text{g ml}^{-1}$. A partir de esta solución madre se efectuaron las correspondientes diluciones con fase móvil. En todos los casos las diluciones se realizaron con matraces aforados y pipetas de doble aforo. El tiempo de retención del metil azinfos fue de aproximadamente 15 min. El método resultó útil para la separación y cuantificación del metil azinfos oxón con un tiempo de retención de alrededor de 18 min. Como criterio de identidad de los organofosforados estudiados se tuvieron en cuenta sus tiempos de retención y los barridos espectrales que se hicieron de los

estándares en el rango de longitudes de onda de 190 a 370 nm. Obtenido el espectro de ambos organofosforados se graficó la primera y segunda derivada de los mismos. Las señales características de las muestras procesadas rutinariamente se compararon por la similitud de estos espectros.

2.2.2 Estudio de estabilidad del metil azinfos

Con el objeto de evaluar la estabilidad del metil azinfos en las condiciones de los bioensayos se usaron dos vasos de precipitados, uno de vidrio y otro de plástico, conteniendo 600 ml de una solución de $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos en agua dechlorada y filtrada. Las soluciones acuosas del pesticida, para todos los ensayos, fueron preparadas a partir de soluciones madre de $4000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos disuelto en acetona, y diluido con cantidad suficiente de agua dechlorada. La concentración de acetona se mantuvo inferior al 0,05% en todas las soluciones usadas. De cada recipiente se tomaron 2 ml de esta solución y se diluyó con un volumen igual de acetonitrilo. La solución resultante se tomó en jeringa con filtro de $0,22 \mu\text{m}$, a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14 y 21 días y se inyectó en el cromatógrafo para estudiar la estabilidad del compuesto en el tiempo.

2.2.3 Ensayo de bioconcentración

En dos peceras de plástico de 1,5 litros de capacidad se agregaron a cada una de ellas 600 ml de agua dechlorada y filtrada. A uno de estos recipientes, se adicionaron 0,75 ml de una solución madre de $4000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos disueltos en acetona, de manera tal que, la concentración final en la pecera tratada con el xenobiótico fue de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, luego de mezclar convenientemente la solución con una varilla de vidrio. El otro recipiente con agua se destinó a los organismos que fueron utilizados como control negativo y a los que a partir de sus homogenatos se adicionaron cantidades conocidas del estándar de metil azinfos con el objeto de determinar la eficiencia de extracción.

Los gastrópodos se colocaron en las peceras plásticas antes mencionadas, y se tomó a partir de este momento el tiempo cero. Tres caracoles expuestos al xenobiótico fueron extraídos con ayuda de una pinza histológica a los 0, 20, 40 minutos y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72 y 96 horas (fase de exposición). Se enjuagaron rápidamente 2 veces en 100 ml de agua destilada con el objeto de eliminar cualquier resto de metil azinfos procedente de la solución acuosa; se colocaron sobre un vidrio de reloj dispuesto sobre hielo. Se retiró con un papel absorbente los restos de agua del enjuague, se eliminó el

2. Materiales y Métodos

caparazón y la totalidad de los tejidos blandos de cada caracol fueron pesados en balanza con sensibilidad al miligramo, con un peso promedio de 187 ± 62 mg. Cada punto estaba representado por la totalidad de los tejidos blandos de un caracol que era homogenizado completando a volumen final de 1,5 ml con agua destilada e inmediatamente conservado en hielo. Los estudios se efectuaron para cada nivel, al menos por triplicado, en condiciones estáticas, sin aireación y sin suministrar alimento.

Durante la fase de eliminación del xenobiótico, un número suficiente de organismos fueron rápidamente enjuagados 2 veces con 100 ml de agua destilada y colocados en una pecera plástica con 600 ml de agua dechlorada: las muestras fueron extraídas y procesadas, durante la fase de eliminación, a los 0, 20, 40 minutos y 1 y 2 horas.

En el caso del bioensayo con *L. variegatus* se siguió la técnica antes mencionada, con la salvedad de que la biomasa obtenida a partir de los cultivos fue enjuagada en forma reiterada con agua con el objeto de eliminar con ayuda de una pipeta Pasteur cualquier resto de papel y/o de materia orgánica y posteriormente colocadas en las peceras plásticas. Para cada nivel, se utilizó en promedio unos 245 ± 67 mg de biomasa correspondiente a un pool de oligoquetos. Debido a su pequeño tamaño resultó imposible trabajar con lombrices individuales.

Del volumen total (1,5 ml) de cada homogenato procedente de los organismos expuestos se tomaron dos volúmenes iguales de 0,5 ml y dispuestos en eppendorfs que contenían 10 μ l de ácido clorhídrico 0,1 N, con el objeto de desproteínizar y se agitó con vortex. Posteriormente a cada eppendorf se agregó 0,5 ml de acetato de etilo. La mezcla final de 1 ml fue vortexeada por 15 segundos y centrifugada a $7000 \times g$ durante 15 minutos. A partir de la fase orgánica superior se pipetearon 400 μ l que se colocan en un eppendorf limpio. Se realizó una segunda extracción con otros 500 μ l de acetato de etilo, con el mismo procedimiento, y se recuperan otros 400 μ l. Es decir, luego de dos extracciones del material biológico con el solvente orgánico se obtuvieron 800 μ l de la fase orgánica del total del mililitro de acetato de etilo agregado. Con esta última solución que contenía al metil azinfos y otras sustancias liposolubles se procedió a evaporar el acetato de etilo con una corriente de nitrógeno llevándolo casi a sequedad. El residuo fue retomado con una jeringa Hamilton con acetonitrilo hasta completar un volumen final de 200 μ l. Con aproximadamente 60 μ l de esta solución se cargó el loop del cromatógrafo de 20 μ l y se procedió a la corrida cromatográfica. Por cada punto se realizaron cuatro corridas y el valor de las áreas obtenidas se promedió.

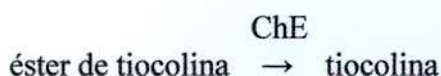
En el caso de los controles negativos se adicionó a los homogenatos 1, 2, 3 y 5 µg de metil azinfos previo a la extracción con acetato de etilo. Efectuado esto se procedió como se indicó anteriormente, con el objeto de determinar la eficiencia de extracción.

La primera corrida cromatográfica se realizó con el control negativo, con la finalidad de descartar cualquier contaminación del inyector con metil azinfos, luego se corrieron las muestras tratadas y por último los controles adicionados de estándar. Entre inyecciones el inyector era lavado con 250 µl de acetonitrilo. Esta rutina se mantuvo cada vez que el equipo de HPLC era usado para procesar las muestras.

2.2.4 Determinación de la acción inhibidora del metil azinfos oxón sobre la colinesterasa por el método de Ellman

Fundamento del método de Ellman y col., 1961

La acetiltiocolina y la butiriltiocolina son hidrolizadas por la AChE o la BChE, respectivamente, produciendo un ácido carboxílico y tiocolina la cual reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB, ácido ditionitrobenzoico) para formar un producto de color amarillo el cual es medido con espectrofotómetro a 412 nm. La velocidad de formación del color es proporcional a la actividad de de AChE o BChE.



Descripción del método

En el caso de *L. variegatus* se partió de un pool de lombrices, perfectamente pesadas, previo a eliminar el exceso de humedad con un papel absorbente, en una balanza con sensibilidad al miligramo. Los tejidos fueron homogenizados en buffer Tris/ClH 20 mM, pH 7,5, adicionado de 0,5 mM de EDTA. Los homogenatos se centrifugaron a 11.000 x g durante 20 minutos a 4 °C.

Al trabajar con *B. glabrata* se partió de un pool de los tejidos blandos de 3 caracoles y se procedió de igual manera que para *L. variegatus*.

En una batería de tubos plásticos se agregaron distintas concentraciones de metil azinfos oxón disuelto en tolueno o etanol absoluto y se evaporó casi a sequedad en

2. Materiales y Métodos

corriente de nitrógeno. A estos tubos se incorporaron, al momento de efectuar la incubación, 300 µl del sobrenadante obtenido luego de la centrifugación de los homogenatos y se procedió a una agitación manual. La incubación se realizó a 37 °C por 15 minutos.

La actividad ChE se midió, por duplicado, en buffer fosfato 100 mM, pH 8,0, 0,2 mM de DTNB y 0,75 mM de AsCh. La actividad se registró continuamente a 412 nm. La lectura cinética se efectuó cada 10 segundos desde 0 a 90 segundos. Los valores se corrigieron por hidrólisis espontánea del sustrato y por la reducción no específica del cromógeno por los extractos titulares. La actividad enzimática se expresó como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

2.2.5 Determinación del contenido proteico en los homogenatos: Método de Lowry y col., 1951

Fundamento del método: se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin dando un complejo coloreado. Este reactivo es una disolución de tungstato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y ácido clorhídrico. El mecanismo del proceso es el siguiente: el Cu^{2+} , en medio alcalino, forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^{+} . Este catión, así como los grupos R de los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin, produciendo inicialmente un producto inestable, que se reduce para formar un compuesto coloreado.

La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas en la disolución.

La concentración de una disolución incógnita puede calcularse interpolando el valor obtenido de absorbancia en una recta de calibración trazada con valores conocidos de concentración de una proteína y sus respectivas absorbancias.

El homogenato se preparó en una dilución 1:30. La curva de calibración se elaboró utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

2.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ D.E (desviación estándar). Las funciones obtenidas fueron sometidas a un análisis de regresión lineal. En el caso de la curva de calibración del pesticida se determinó la recta de regresión por el método de los cuadrados mínimos. Se realizó, en la misma, la suma de cuadrados de los residuales, la desviación estándar de la ordenada en el origen y de la pendiente y los intervalos de confianza de la ordenada en el origen y de la pendiente para un grado de confianza del 95% (Miller y Miller, 2002). A partir de estos datos se calculó el límite de detección y de cuantificación del metil azinfos para el método propuesto. Para los estudios de toxicocinética, los datos experimentales se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo. La función exponencial utilizada, $y = a (1 - e^{-bx})$, (Box Lucas 1) pertenece al software ORIGIN.

Los distintos tratamientos se analizaron utilizando ANOVA de un factor y las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba de Tukey-Kramer (Sokal y Rohlf, 1997). Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

Los valores del efecto de la concentración 50 y los intervalos de confianza (95%) se usaron para determinar la concentración de metil azinfos oxón que produce *in vitro* un 50% de inhibición sobre la actividad ChE (CI₅₀). Éstas se calcularon empleando el Programa de Análisis Probit, versión 1.5 (US EPA, 1992). Los cálculos realizados por el programa están basados en Finney (1971).

3. Resultados

3.1 Desarrollo de un método analítico para la separación y cuantificación del metil azinfos por HPLC

3.1.1 Separación y cuantificación del metil azinfos

La figura 3.1 representa el cromatograma de una solución patrón de metil azinfos disuelto en fase móvil: acetonitrilo-agua (45:55 V/V). El tiempo de retención para este insecticida fue de aproximadamente 15 min. El cromatograma elegido corresponde a una concentración de la solución patrón de $0,11 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos y se ha seleccionado con el objeto de ilustrar una concentración cercana al límite de cuantificación en agua, cuyo análisis estadístico se desarrolla más adelante. A pesar de encontrarnos a una concentración donde el ruido del equipo es evidente (5,7-6,2 min) la señal correspondiente al metil azinfos resultó nítida y el área integrada fue de 22.974.

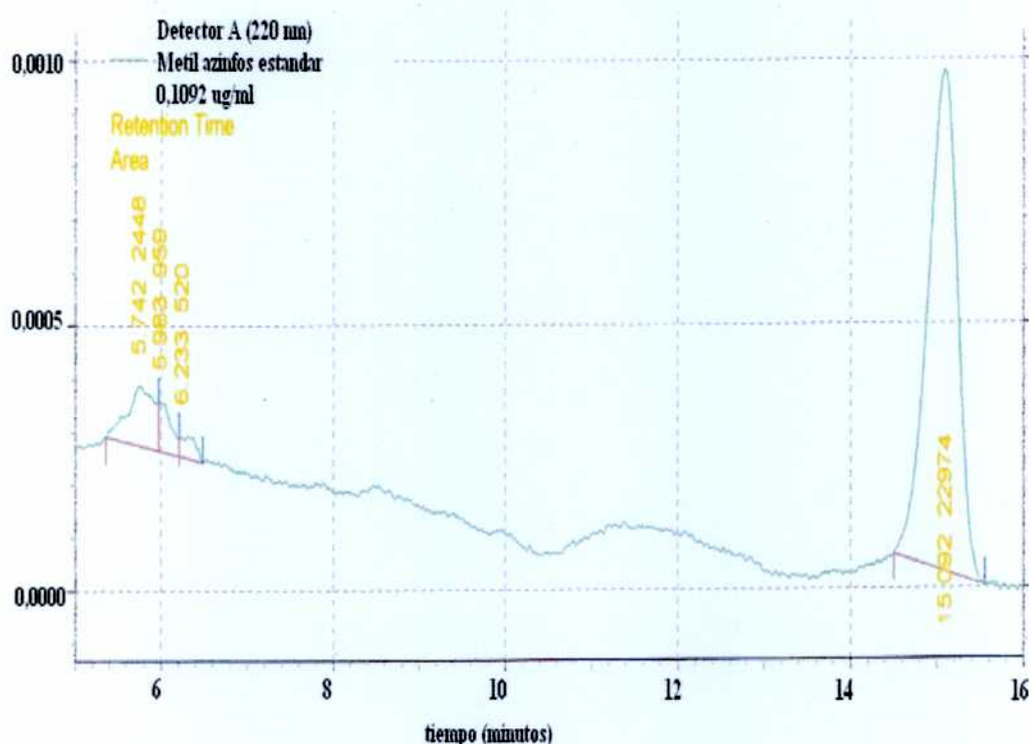


Figura 3.1: Cromatograma del metil azinfos. Los números en amarillo representan los tiempos de retención y áreas a cada uno de los picos señalados

Las figuras 3.2 a, b y c representan el espectro de absorción del metil azinfos entre 190 y 370 nm, su primera y segunda derivada, respectivamente. La identificación del compuesto se realizó considerando su tiempo de retención y la similitud de los barridos espectrales en las muestras de agua y en las matrices biológicas. Para el caso del metil azinfos se puede observar, en la Figura 3.2 a, un máximo de absorción a

3. Resultados

220 nm. Por este motivo, esta fue la longitud de onda seleccionada en el desarrollo del método analítico.

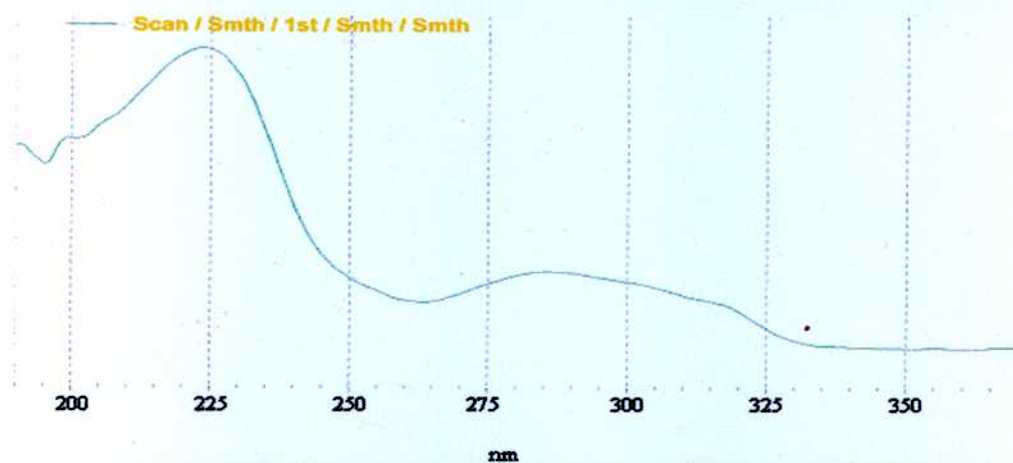


Figura 3.2 a: Barrido espectral del metil azinfos en acetonitrilo-agua (45:55 V/V)

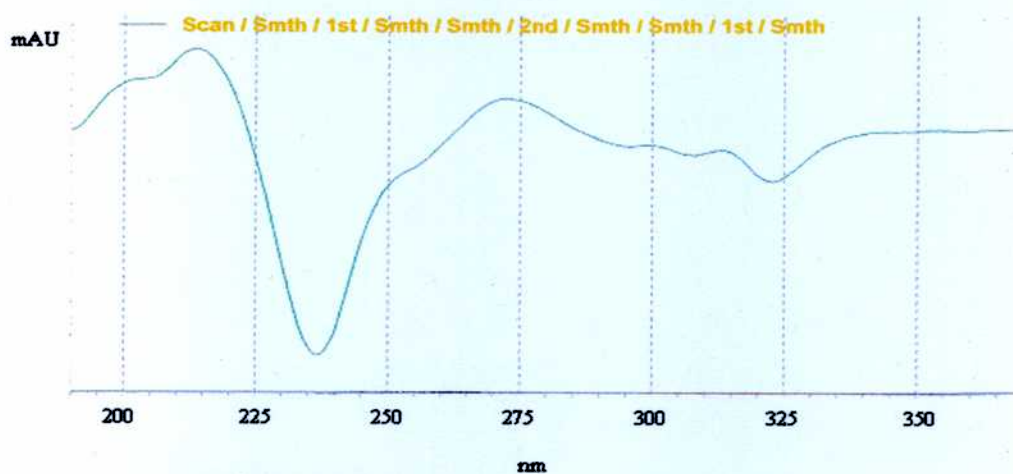


Figura 3.2 b: Primera derivada

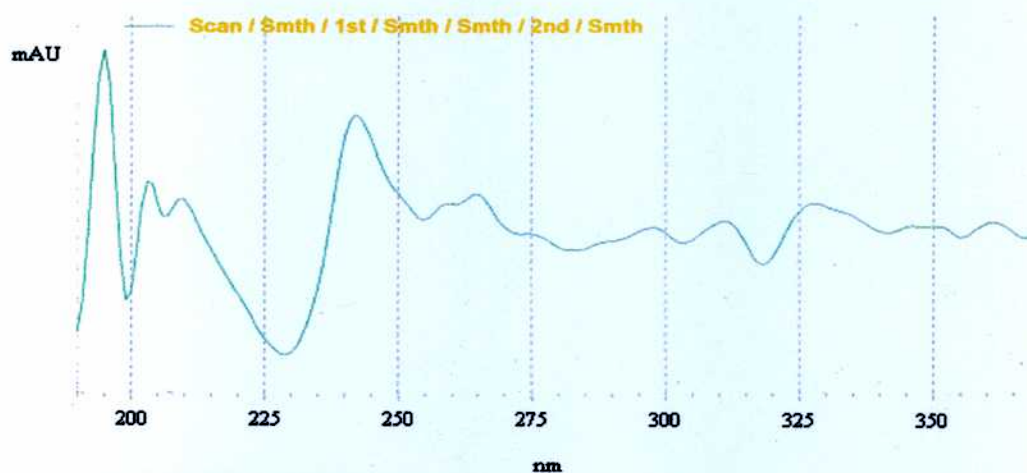


Figura 3.2 c: Segunda derivada

3.1.1.1 Curva de calibración

Las Figuras 3.3 a y b son las representaciones gráficas de las áreas promedio obtenidas luego de la corrida cromatográfica de una solución patrón de metil azinfos, a partir de seis concentraciones diferentes. Los primeros cuatro puntos, correspondientes a las mayores diluciones, pueden verse con detalle en la Figura 3.3 b.

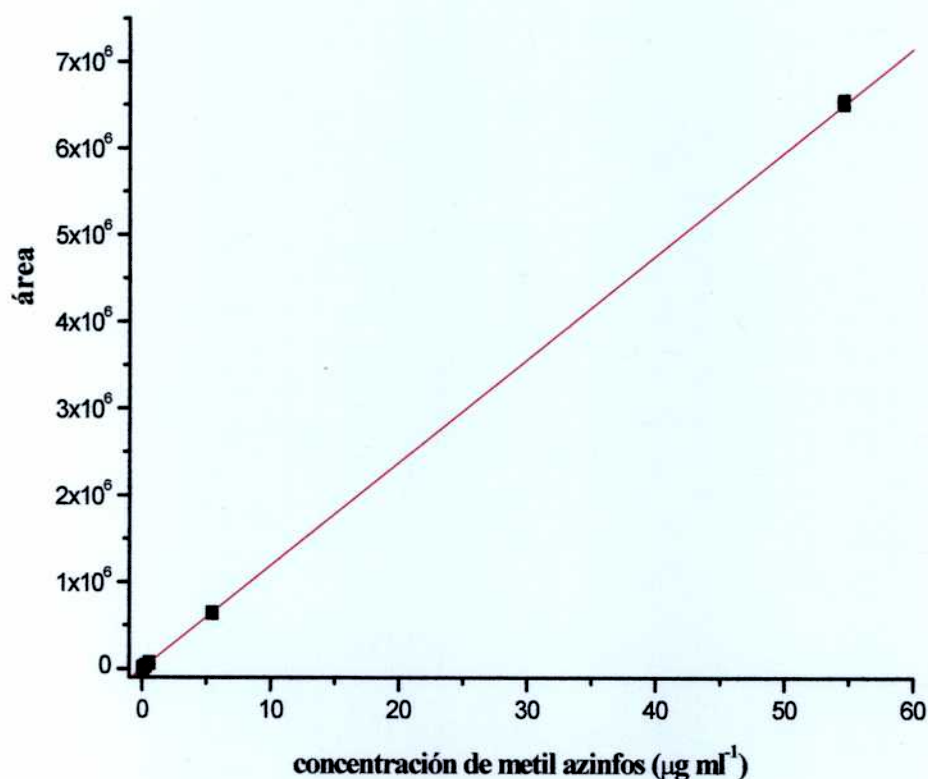


Figura 3.3 a: Gráfico del área en función de la concentración de metil azinfos ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

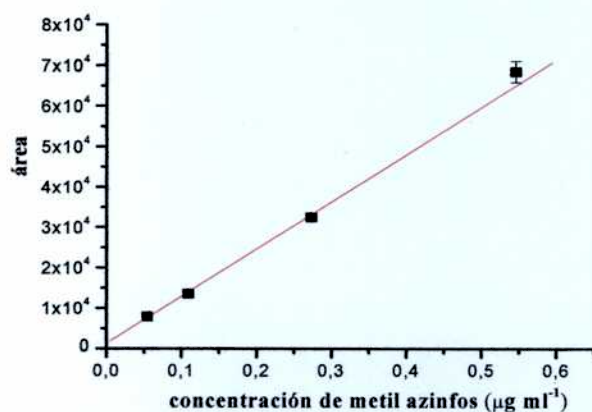


Figura 3.3 b: Detalle del gráfico anterior ($0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ - $0,55 \mu\text{g ml}^{-1}$)

3. Resultados

3.1.1.2 Linealidad

El análisis de linealidad se realizó en un rango de concentraciones comprendido entre $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $54,6 \mu\text{g ml}^{-1}$. El número de puntos utilizados para efectuar la curva de calibración fue de seis. Para cada nivel se usaron cinco determinaciones independientes, se calculó el área promedio y su desviación estándar.

Las muestras analizadas se prepararon por dilución en una mezcla de acetonitrilo-agua (45:55 V/V) de una solución madre en acetonitrilo que contenía $546 \mu\text{g}$ de metil azinfos por cada mililitro, realizadas el mismo día del análisis. A partir de dichos resultados se determinó la siguiente recta de regresión por el método de los cuadrados mínimos:

$$\text{Área} = y = mx + b$$

$$\text{Área} = 118.736,73x (\mu\text{g ml}^{-1}) + 974,10$$

El coeficiente de correlación fue:

$$R = 0,99973$$

$$n = 6$$

La suma de cuadrados de los residuales, la desviación estándar de la ordenada en el origen (D.E. de la ordenada en el origen) y de la pendiente (D.E. de la pendiente) y los intervalos de confianza de la ordenada en el origen (I. C. de la ordenada en el origen) y de la pendiente (I.C. de la pendiente) para un grado de confianza del 95% (Miller y Miller, 2002) se muestran a continuación:

$$\text{Suma de cuadrados de los residuales} = 3,000208 \times 10^8$$

$$\text{D.E. de la ordenada en el origen} = 1984,24$$

I.C. de la ordenada en el origen:

$$\text{Límite inferior} = - 4.163,12$$

$$\text{Límite superior} = + 6.035,38$$

$$\text{D.E. de la pendiente} = 1,81$$

I.C. de la pendiente:

$$\text{Límite inferior} = +118.729,07$$

$$\text{Límite superior} = +118.738,40$$

3. Resultados

3.1.1.3 Determinación del límite de detección y de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se calculan a partir de la desviación estándar de la ordenada en el origen según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Límite de detección} = \frac{3,3 \times \text{desviación estándar}}{\text{pendiente}} = 0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times \text{desviación estándar}}{\text{pendiente}} = 0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$$

3. Resultados

3.1.2 Estabilidad del metil azinfos en agua

Las Figuras 3.4 y 3.5 representan la concentración de metil azinfos ($\mu\text{g ml}^{-1}$) en función del tiempo, en agua declorada en las condiciones de fotoperíodo de los bioensayos. En la primera figura el recipiente utilizado fue un vaso de precipitado de vidrio de 200 ml de capacidad; en la segunda, y en las mismas condiciones experimentales, el recipiente que se usó era de plástico.

Los ensayos de estabilidad del metil azinfos se hicieron en ambos tipos de materiales con el objeto de comprobar el comportamiento del pesticida frente a los mismos. Del análisis de ambos gráficos surge que la variación de la concentración del pesticida en el tiempo es la misma de manera independiente al tipo de recipiente utilizado, sea vidrio o plástico. Estos resultados permiten descartar procesos de adsorción del pesticida en algún tipo de material, dado que las concentraciones iniciales en ambos ensayos y hasta las 96 horas no difieren significativamente de la concentración inicial a tiempo cero. Más aún, se puede observar una ligera tendencia a un aumento de la concentración desde el día cuarto al séptimo. Esto se debe a que la solución, al estar en contacto con la atmósfera, evaporó agua y se concentró ligeramente. A partir del día séptimo, se verifica una tendencia franca a disminuir la concentración del metil azinfos en la solución: la pérdida del pesticida por volatilización y/o degradación ya no es compensada por el incremento de su concentración debido a la evaporación del agua.

De acuerdo a estos resultados experimentales, la constancia de concentración del pesticida durante las primeras 96 horas permitió seleccionar un sistema estático para el desarrollo de los bioensayos utilizando peceras plásticas.

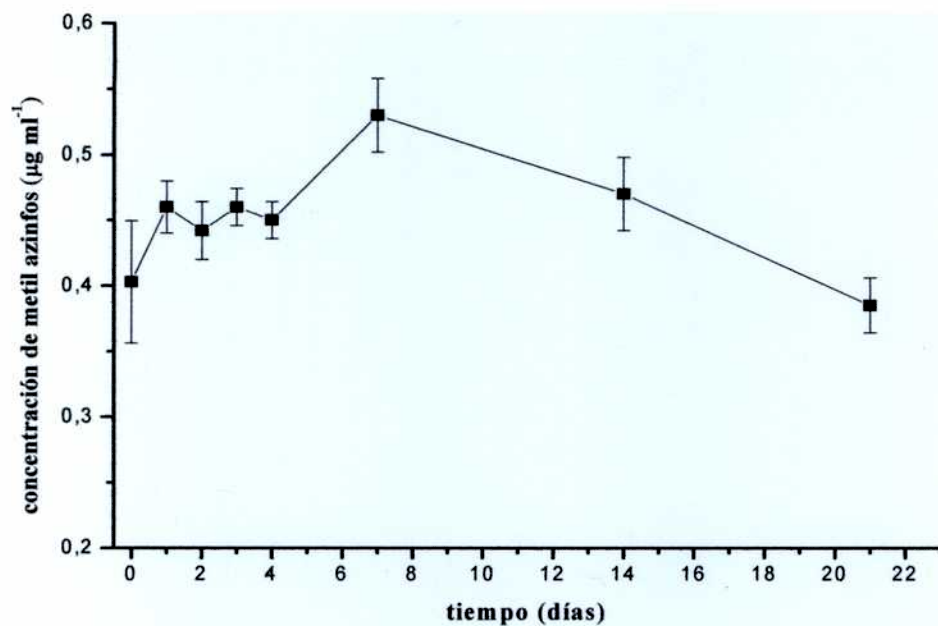


Figura 3.4: concentración de metil azinfos ($\mu\text{g ml}^{-1}$) en función del tiempo, en agua declorada en las condiciones de fotoperíodo de los bioensayos, en vaso de precipitado de vidrio de 200 ml de capacidad

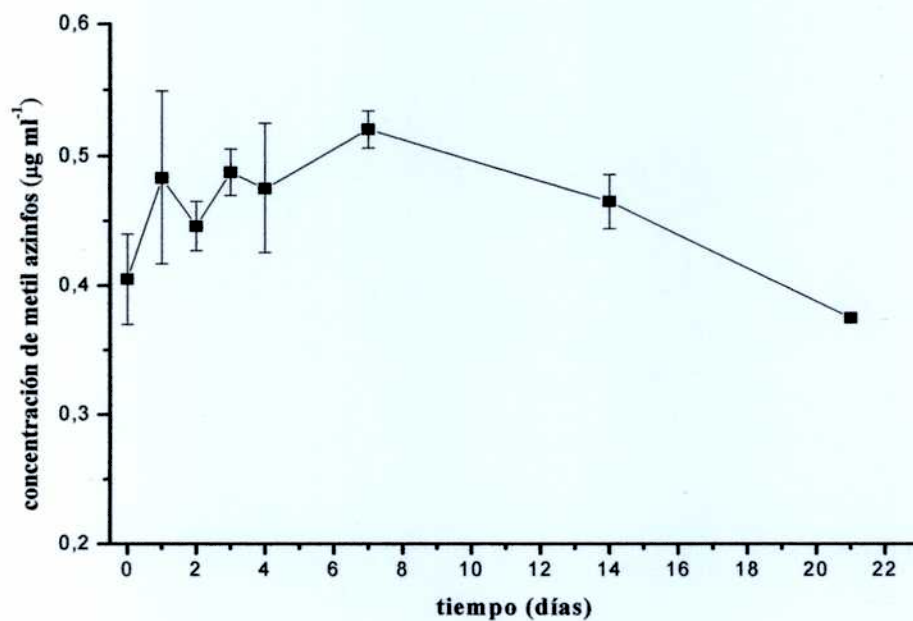


Figura 3.5: concentración de metil azinfos ($\mu\text{g ml}^{-1}$) en función del tiempo, en agua declorada en las condiciones de fotoperíodo de los bioensayos, en vaso de precipitado de plástico de 200 ml de capacidad

3. Resultados

3.1.3 Validación del método analítico

Se dice que un método analítico es específico cuando es capaz de determinar cualitativamente el analito sin interferencias de ningún otro compuesto.

El método de HPLC desarrollado se muestra como específico, comprobándose que no existe ninguna sustancia que interfiera en el análisis del metil azinfos tanto en las muestras procedentes de agua declorada, como las provenientes de las matrices biológicas. Se comprueba que, a la longitud de onda del análisis, 220 nm, no existen interferencias en los controles negativos de agua declorada filtrada mediante filtro de 0,22 μm , ni en los extractos obtenidos a partir de *L. variegatus* y *B. glabrata*, dado que al tiempo de retención en la que aparece la señal del xenobiótico ninguna señal aparece como interferencia.

En la Figura 3.5 puede observarse, a modo de ejemplo, un cromatograma obtenido a partir de un homogenato de *B. glabrata* que no estuvo expuesto al insecticida: ninguna señal aparece como interferencia entre los 14 y 15 minutos de la corrida cromatográfica correspondiente a la señal del metil azinfos. Un patrón muy similar se obtuvo a partir de los controles negativos de *L. variegatus*.

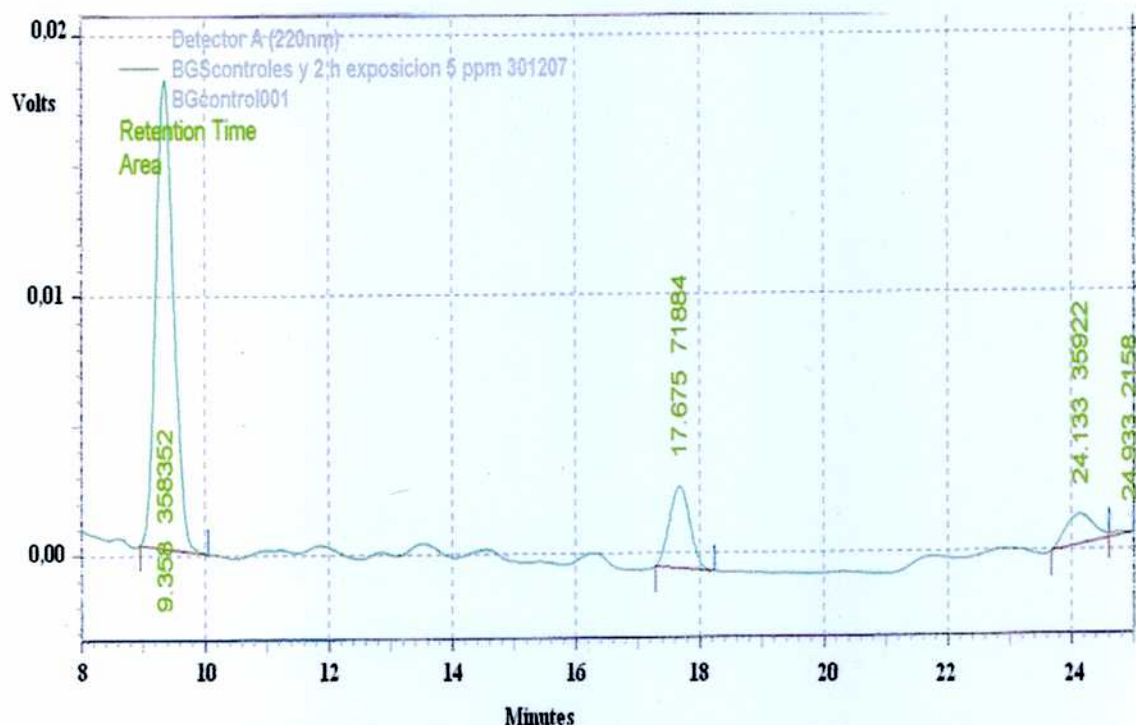


Figura 3.5: Cromatograma correspondiente a un control negativo en *B. glabrata*

3. Resultados

3.1.4 Eficiencia de extracción del metil azinfos a partir de las matrices biológicas

Las Figuras 3.6 y 3.7 son los cromatogramas obtenidos luego de la adición de cantidades conocidas de metil azinfos a los homogenatos de ambas especies de invertebrados utilizados como controles negativos. Los datos de recuperación del metil azinfos se muestran en las Tablas 3.1 y 3.2. En ambas matrices biológicas la eficiencia de extracción promedio fue del 99%, por lo que los resultados de los bioensayos no fueron corregidos por este factor.

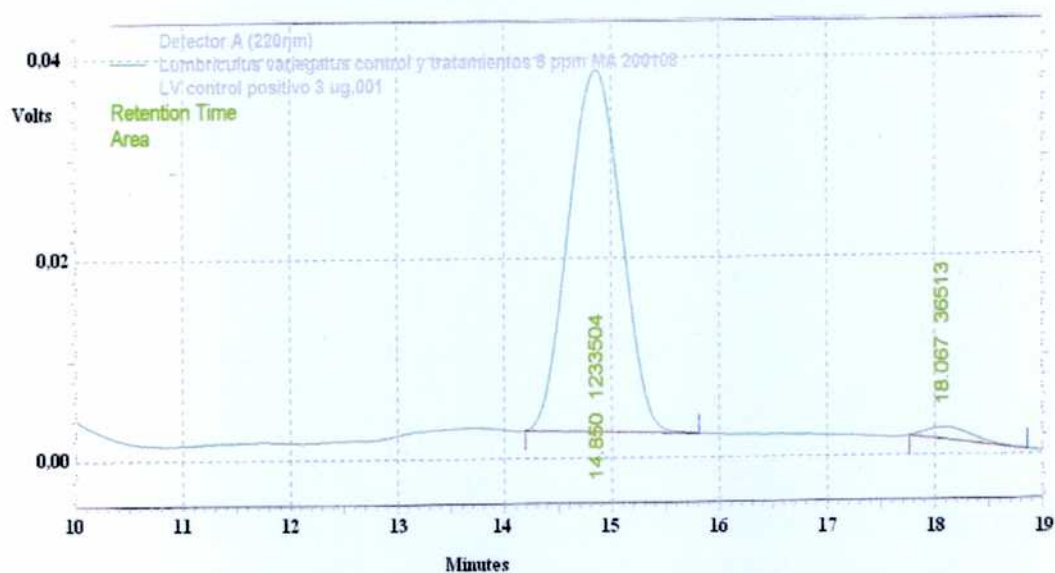


Figura 3.6: Cromatograma de un control positivo en *L. variegatus* adicionado con 3 μ g de metil azinfos

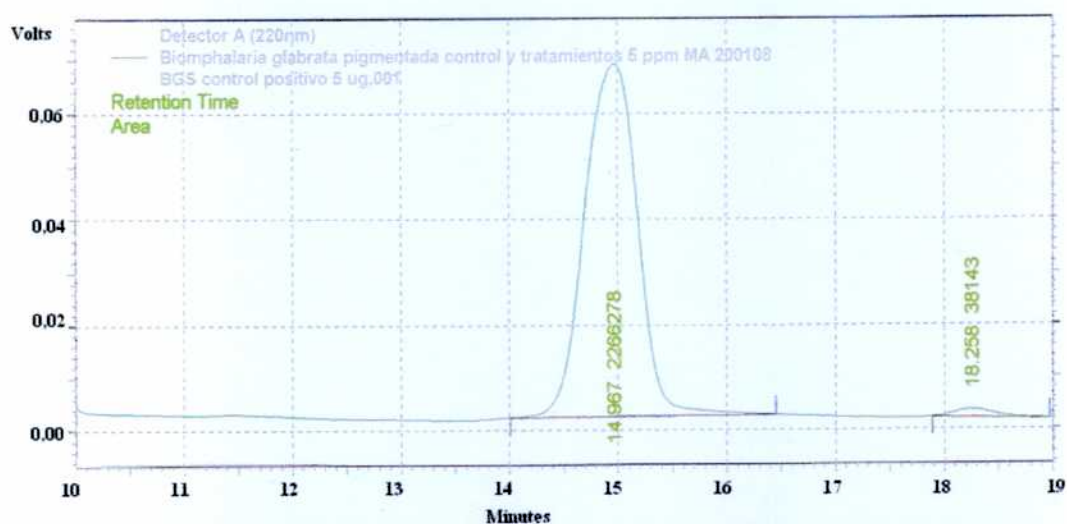


Figura 3.7: Cromatograma de un control positivo en *B. glabrata* adicionado con 5 μ g de metil azinfos

3. Resultados

Tabla 3.1: Recuperación de metil azinfos adicionado a homogenatos de *B. glabrata*

cantidad adicionada	cantidad recuperada	% recuperado
(μg)	(μg)	
1,0	1,02	102
	1,03	103
	0,98	98
	0,96	96
2,0	2,26	113
	1,79	90
	1,82	91
	1,90	95
3,0	2,93	98
	2,83	94
	2,84	95
	2,85	95
5,0	5,4	108
	4,69	94
	5,18	104
	5,2	104

Media $\pm$ D.E. = 99 ± 6

Tabla 3.2: Recuperación de metil azinfos adicionado a homogenatos de *L. variegatus*

cantidad adicionada	cantidad recuperada	% recuperado
(μg)	(μg)	
1,0	1,10	110
	1,02	102
	0,97	97
	0,98	98
2,0	2,24	112
	1,84	92
	1,86	93
	1,96	98
3,0	2,95	98
	2,89	96
	2,92	97
	2,85	95
5,0	5,07	101
	4,77	95
	4,96	99
	5,15	103

Media $\pm$ D.E. = 99 ± 5

3. Resultados

A modo de resumen, podemos decir que los límites de detección y de cuantificación del pesticida fueron, en solución acuosa, de $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$. Estas concentraciones se corresponden con áreas de 7.505 y 20.803, respectivamente. Para referir estos límites de detección y de cuantificación en el caso de las matrices biológicas, teniendo en cuenta que la eficiencia de extracción promedio con acetato de etilo fue para ambas especies del 99%, y con el objeto de poder expresarlos en microgramos de metil azinfos contenidos en cada gramo de biomasa húmeda, se utilizó la siguiente conversión correspondiente al diseño experimental:

$$\frac{\mu\text{g de metil azinfos}}{\text{g tejido húmedo}} = \frac{(a - 974,10)}{118.736,73} \times f \times \frac{1}{m_{0,5}}$$

Donde:

$$\frac{(a - 974,10)}{118.736,73} = \mu\text{g de metil azinfos en 1 ml de acetonitrilo (ver curva de calibración)}$$

$$f = \frac{200}{800} = \frac{\text{volumen final de 200 } \mu\text{l obtenido a partir del extracto original en acetato de etilo, llevado casi a sequedad, y retomado a dicho volumen con acetonitrilo}}{\mu\text{l de acetato de etilo recuperados luego de dos extracciones sucesivas del homogenato con 500 } \mu\text{l de acetato de etilo, cada una}}$$

$m_{0,5}$: gramos de biomasa contenidos en 0,5 ml de homogenato. Para calcular el límite de detección a partir de la biomasa utilizamos el valor promedio de 0,07 g

De esta manera, los límites de detección y cuantificación en las matrices biológicas fueron de $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ y $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$.

3.2 Toxicocinética del metil azinfos en *B. glabrata*

La Figura 3.8 representa la cinética de absorción de metil azinfos por *B. glabrata* y el aparente estado estacionario alcanzado durante una exposición constante a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ del pesticida, correspondiente a la CI_{50} de la actividad ChE. Ningún efecto adverso se observó en los gastrópodos durante la fase de exposición. El tamaño de los caracoles usados fue similar en todos los ensayos, correspondiendo a ejemplares adultos del fenotipo pigmentado en todos los casos, con un peso promedio de tejido húmedo de $187 \pm 62 \text{ mg}$. De esta manera, las velocidades de absorción no fueron sesgadas debido al tamaño del organismo. Los datos experimentales se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación $C_o = k_1/k_2 C_w (1 - e^{-k_2 t})$ y se calcularon los valores de k_1 y k_2 . La función exponencial utilizada (Box Lucas 1), $y = a (1 - e^{-bx})$, frente a los resultados presentados permite calcular con la mayor bondad de ajuste, por sucesivas iteraciones, los parámetros a y b ; donde, $a = k_1/k_2 C_w$, $b = k_2$ y, $C_w =$ concentración del metil azinfos en el agua, fue constante y comprobada experimentalmente ($5,00 \pm 0,10 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante la exposición.

Los resultados obtenidos fueron para la constante de absorción teórica, $k_1 = 6,56 \pm 0,13 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y, para la constante de eliminación teórica, $k_2 = 0,76 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. Según este modelo el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a las 4 horas de exposición. El FBC_{cin} teórico resultó de $8,63 \pm 0,17 \text{ ml g}^{-1}$.

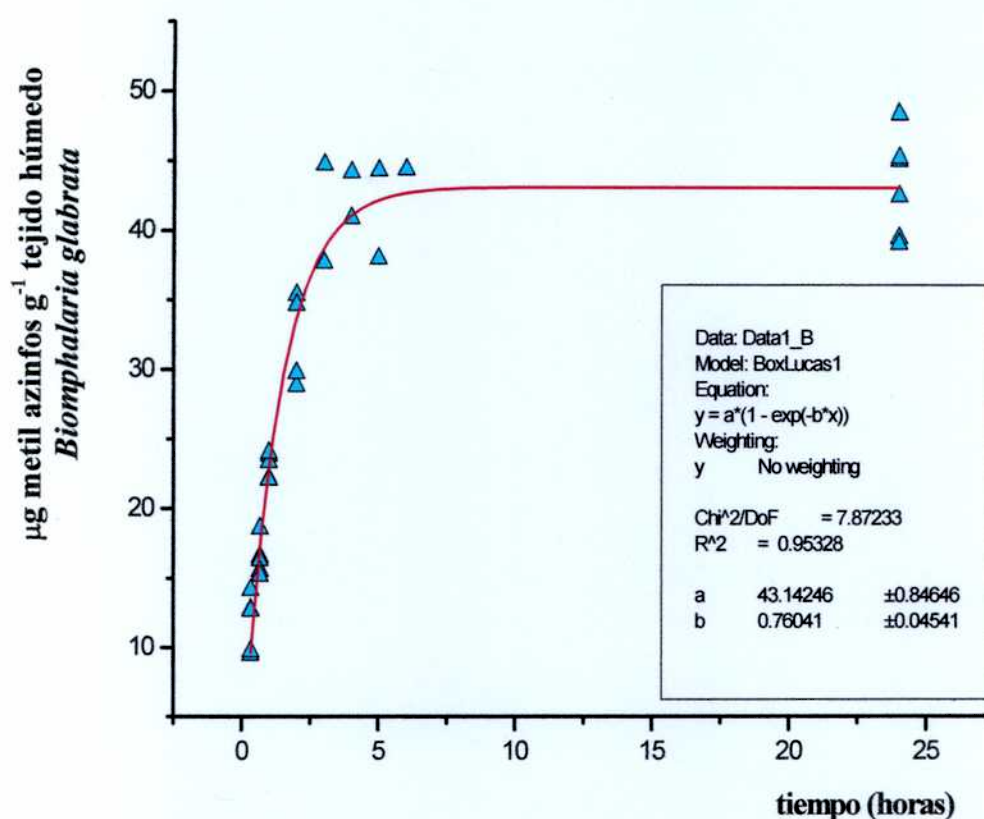


Figura 3.8: Toxicocinética del metil azinfos en *B. glabrata*. La línea continua muestra el modelo teórico ajustado

La Figura 3.9 ilustra la curva de decaimiento exponencial de primer orden de la concentración de metil azinfos en los tejidos blandos totales de *B. glabrata*, luego de las 24 horas de exposición al insecticida, en función del tiempo de depuración, es decir, al pasar a los organismos a un medio no contaminado. Esta fase de depuración, caracterizada por la eliminación y la biotransformación del compuesto parental presentó un coeficiente de determinación, $R^2 > 0.99$. La representación logarítmica lineal de la misma puede observarse en la Figura 3.10, con un coeficiente de correlación, $R = -0.9919$, y un $R^2 = 0.984$.

La ecuación de la recta correspondiente a la Figura 3.10 obtenida por regresión lineal fue: $\ln C = -0.62 t + 3.68$ (ver ecuaciones cinéticas en 1.2.1.1), donde:

$$k_2 = 0.62 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_2$$

$$t_{1/2} = 67 \text{ min}$$

3. Resultados

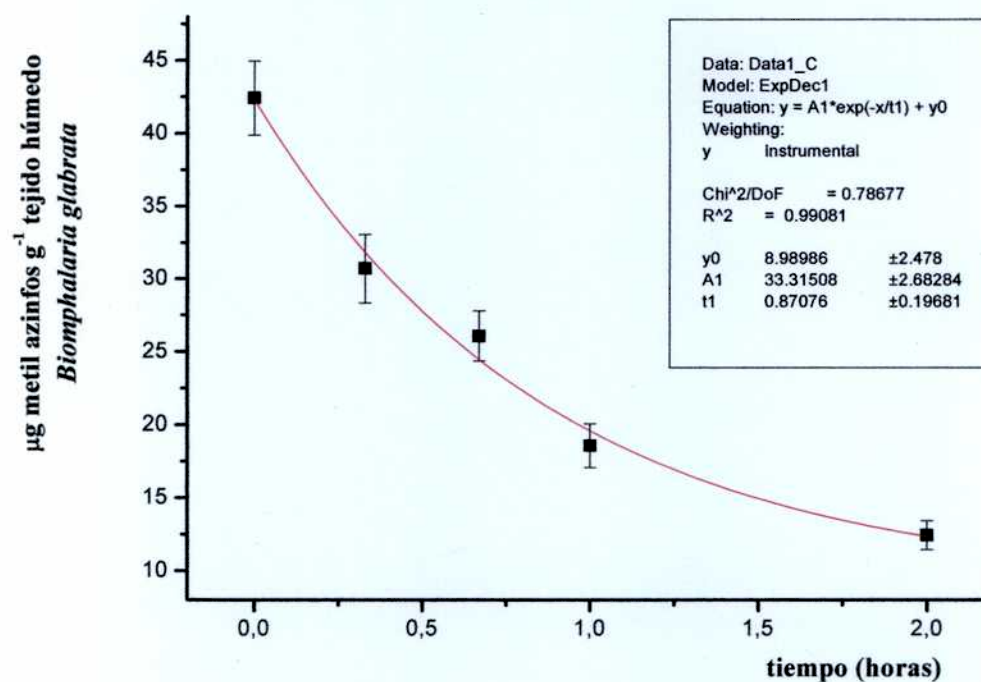


Figura 3.9: Curva de decaimiento exponencial durante la fase de depuración: μg metil azinfos g^{-1} tejido húmedo en *B. glabrata* en función del tiempo (horas)

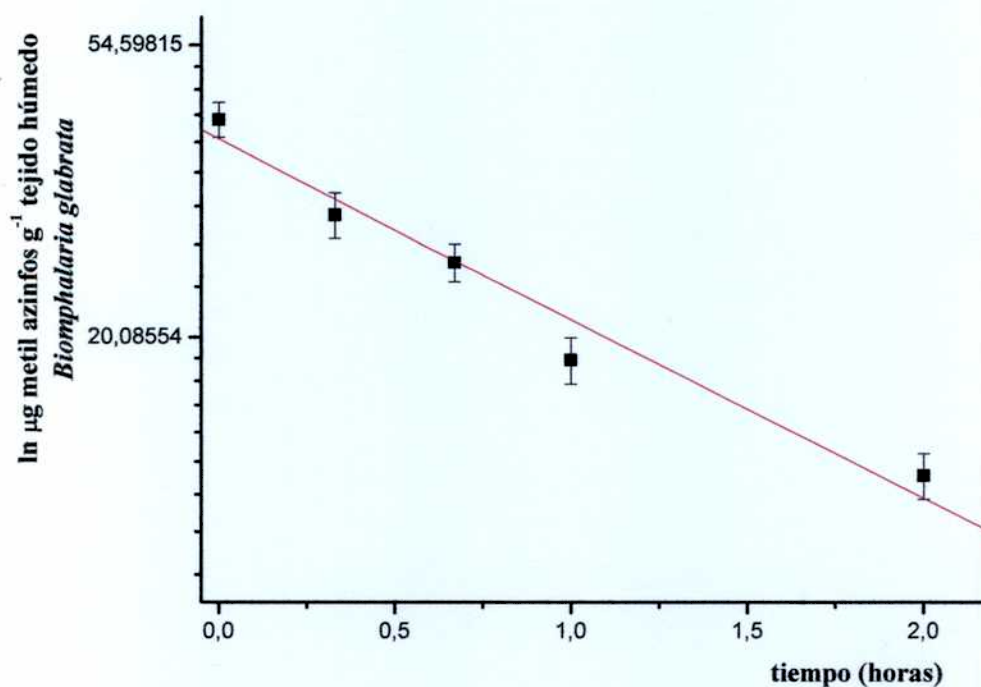


Figura 3.10: $\ln \mu\text{g}$ metil azinfos g^{-1} tejido húmedo en *B. glabrata* en función del tiempo de depuración (horas)

3. Resultados

El modelo utilizado permite calcular las variables a y b de dos maneras diferentes: la primera, variando a la vez, a y b , es decir, el modelo teórico obtenido a partir de los datos experimentales de la etapa de exposición al pesticida; la segunda, representa el modelo experimental, pues utiliza los datos de la anterior, pero fija el valor de b (k_2), que lo hemos calculado experimentalmente durante la fase de depuración.

La figura 3.11 representa la cinética de absorción y el aparente estado estacionario alcanzado en *B. glabrata* durante la exposición por 24 horas a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos. A diferencia del modelo teórico de la Figura 3.8, en el presente, sólo se tienen en cuenta los resultados experimentales obtenidos durante las etapas de absorción, estado estacionario y depuración. En este modelo experimental el valor de b (k_2) se fijó en $0,62 \text{ h}^{-1}$ (calculado experimentalmente) y la variable fue " a ". De esta manera, se obtuvo la constante de absorción, $k_1 = 5,58 \pm 0,14 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y el FBC_{cin} fue de $9,00 \pm 0,19 \text{ ml g}^{-1}$

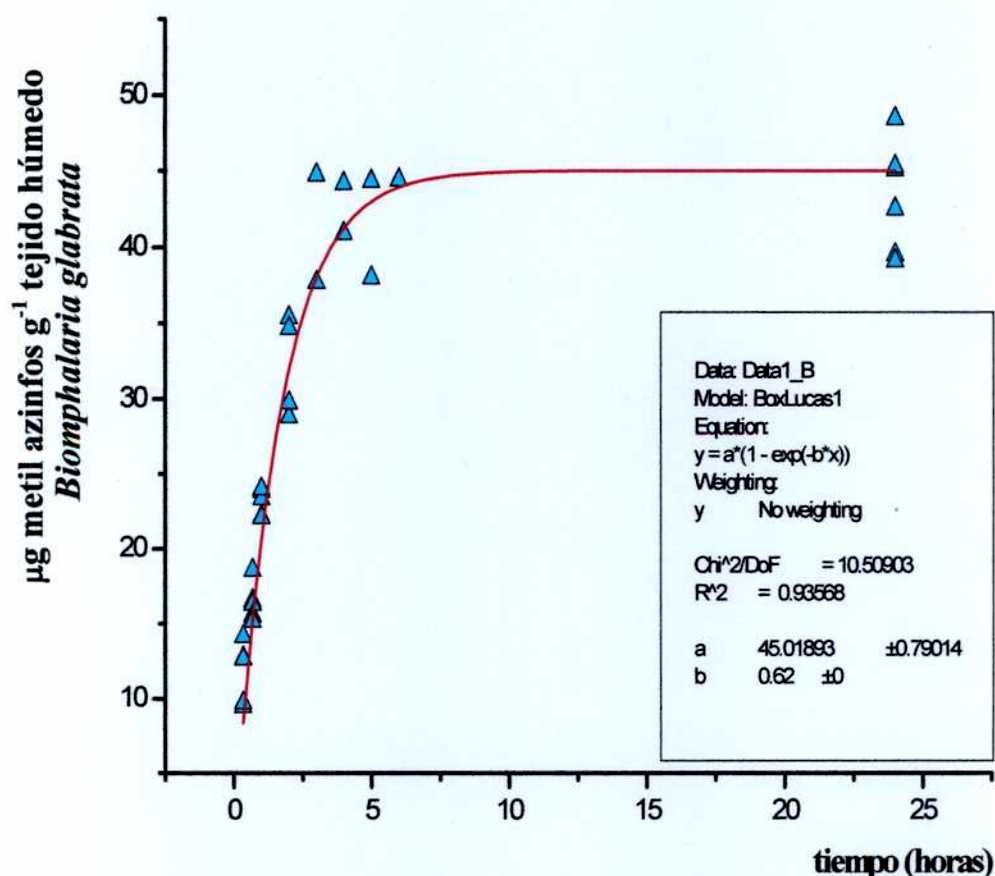


Figura 3.11: Toxicocinética del metil azinfos en *B. glabrata*. La línea continua muestra el modelo experimental ajustado

3. Resultados

Los estudios toxicocinéticos en *B. glabrata* a concentraciones de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos también se realizaron durante 96 horas y se procedió a calcular la k_2 durante la fase de depuración. En este sentido, la k_2 obtenida a partir de las 96 horas fue de $0,73 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$, es decir, muy similar a la calculada a partir de las 24 horas. No obstante, se observó a partir de las 72 horas de exposición una moderada tendencia a salir del estado estacionario, con menores concentraciones titulares del compuesto parental.

Con el objeto de demostrar que las cinéticas de absorción y de eliminación del pesticida eran dependientes de la concentración del mismo en la fase acuosa, estudiamos la toxicocinética del metil azinfos en *B. glabrata* con una exposición del pesticida a $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 3.12), mucho menor a la de la CI_{50} utilizada anteriormente.

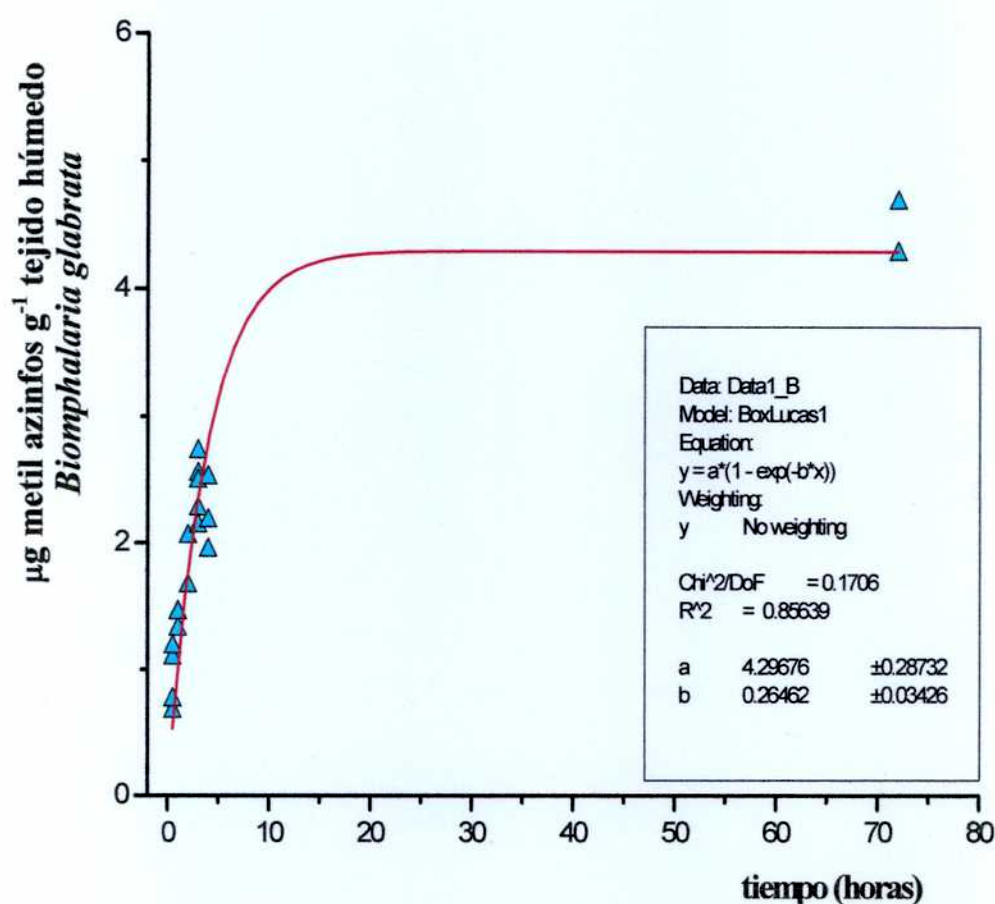


Figura 3.12: Toxicocinética del metil azinfos en *B. glabrata* con una exposición del pesticida a $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$. La línea continua muestra el modelo teórico ajustado

3. Resultados

En este caso, el modelo teórico permitió calcular un valor de $k_1 = 1,62 \pm 0,11$ $\text{ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una $k_2 = 0,26 \pm 0,03$ h^{-1} . Es decir, unas 4 y 2,8 veces menores que los obtenidos frente a una exposición unas siete veces mayor. Por lo tanto, la absorción y la eliminación ocurren más lentamente a menores concentraciones de exposición. En este caso, el FBC_{cin} fue de $6,23 \pm 0,14$ ml g^{-1} , un 38% menor que el obtenido frente a una exposición mayor al pesticida. Por otro lado, si bien el estado estacionario aparente se alcanza relativamente rápido como en el caso anterior, a esta menor concentración ocurrió dentro de las 14 horas de exposición, a diferencia de la mayor concentración que se produjo dentro de las 4 horas.

3.3 Toxicocinética del metil azinfos en *L. variegatus*

La Figura 3.13 representa la cinética de absorción de metil azinfos por *L. variegatus* y el aparente estado estacionario alcanzado durante una exposición constante a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ del pesticida. En el caso del oligoqueto, la sintomatología colinérgica aparece de manera casi instantánea con una marcada cianosis durante las primeras horas de exposición que tiende a desaparecer gradualmente pero los síntomas en la motilidad son visibles durante todo el bioensayo. Las lombrices tienden a permanecer agregadas. No obstante, no se observó mortalidad a pesar de una inhibición prácticamente total de la actividad ChE.

Los resultados obtenidos fueron para la constante de absorción teórica, $k_1 = 7,71 \pm 0,35 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y, para la constante de eliminación teórica, $k_2 = 0,70 \pm 0,10 \text{ h}^{-1}$. Según este modelo el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a las 5 horas de exposición. El FBC_{cin} teórico resultó de $11,01 \pm 0,45 \text{ ml g}^{-1}$.

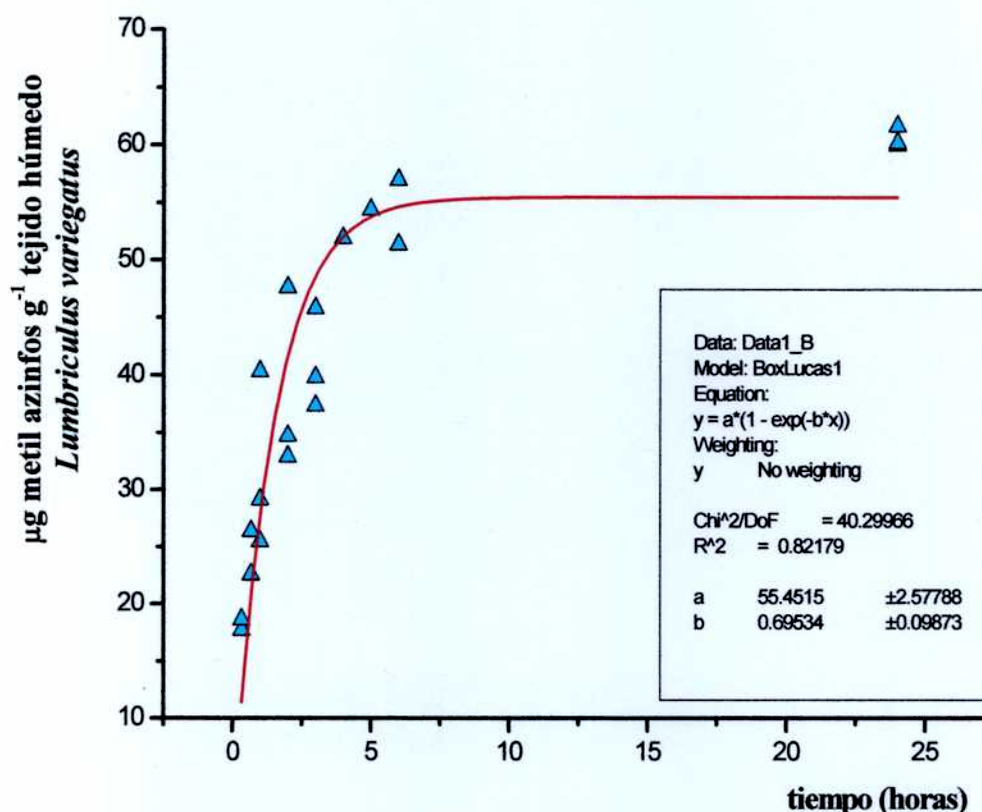


Figura 3.13 Toxicocinética del metil azinfos en *L. variegatus*. La línea continua muestra el modelo teórico ajustado

3. Resultados

La Figura 3.14 representa la curva de decaimiento exponencial de primer orden de la concentración de metil azinfos en un pool de los tejidos de *L. variegatus*, luego de 24 horas de exposición al insecticida, en función del tiempo de depuración, al pasar a los organismos a un medio no contaminado. La fase de depuración presentó un coeficiente de determinación, $R^2 > 0,999$.

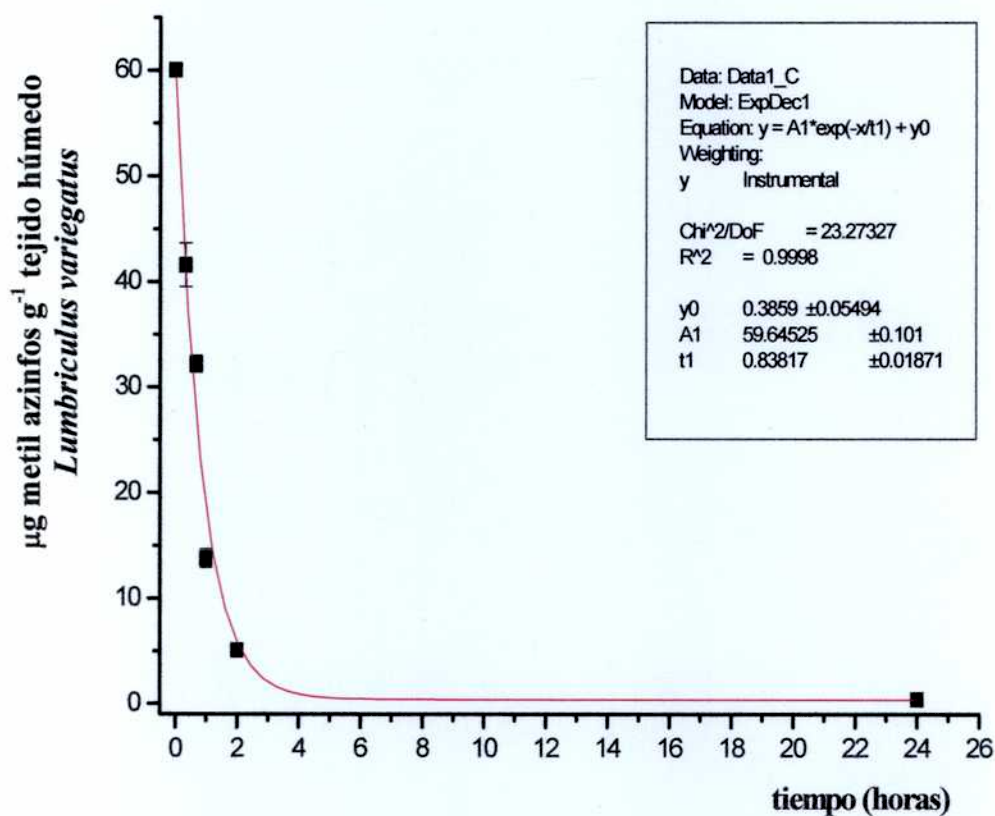


Figura 3.14: Curva de decaimiento exponencial durante la fase de depuración: $\mu\text{g metil azinfos g}^{-1}$ tejido húmedo en *L. variegatus* en función del tiempo

3. Resultados

La representación logarítmica lineal de la misma puede observarse en la Figura 3.15, con un coeficiente de correlación, $R = -0,983$, y un $R^2 = 0,966$.

La ecuación de la recta correspondiente a la Figura 3.15 obtenida por regresión lineal fue: $\ln C = -1,11t + 4,09$; donde:

$$k_2 = 1,11 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_2$$

$$t_{1/2} = 37 \text{ min}$$

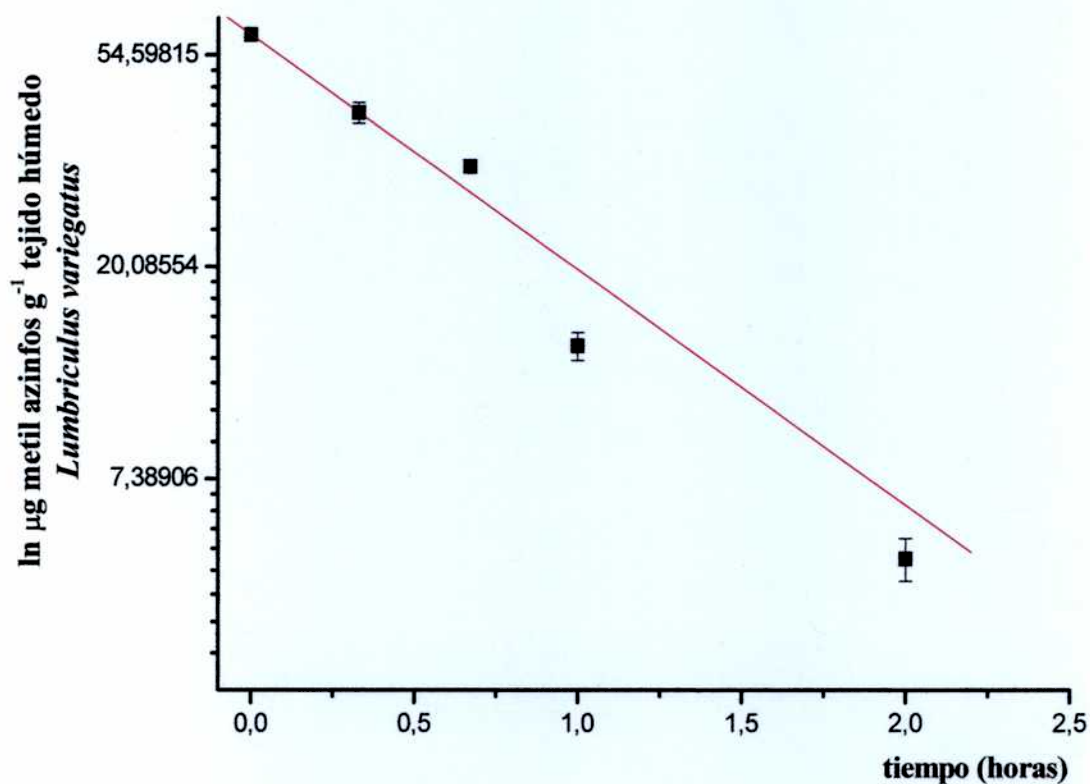


Figura 3.15: $\ln \mu\text{g}$ metil azinfos g^{-1} tejido húmedo en *L. variegatus* en función del tiempo de depuración (horas)

3. Resultados

La figura 3.16 ilustra la cinética de absorción y el estado estacionario aparente en *L. variegatus* durante 24 horas de exposición a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos. En este modelo experimental el valor de b (k_2) calculado experimentalmente fue de $1,11 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ y la variable es “a”. Los resultados obtenidos fueron: la constante de absorción, $k_1 = 11,16 \pm 0,16 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y el $\text{FBC}_{\text{cin}} = 10,05 \pm 0,19 \text{ ml g}^{-1}$.

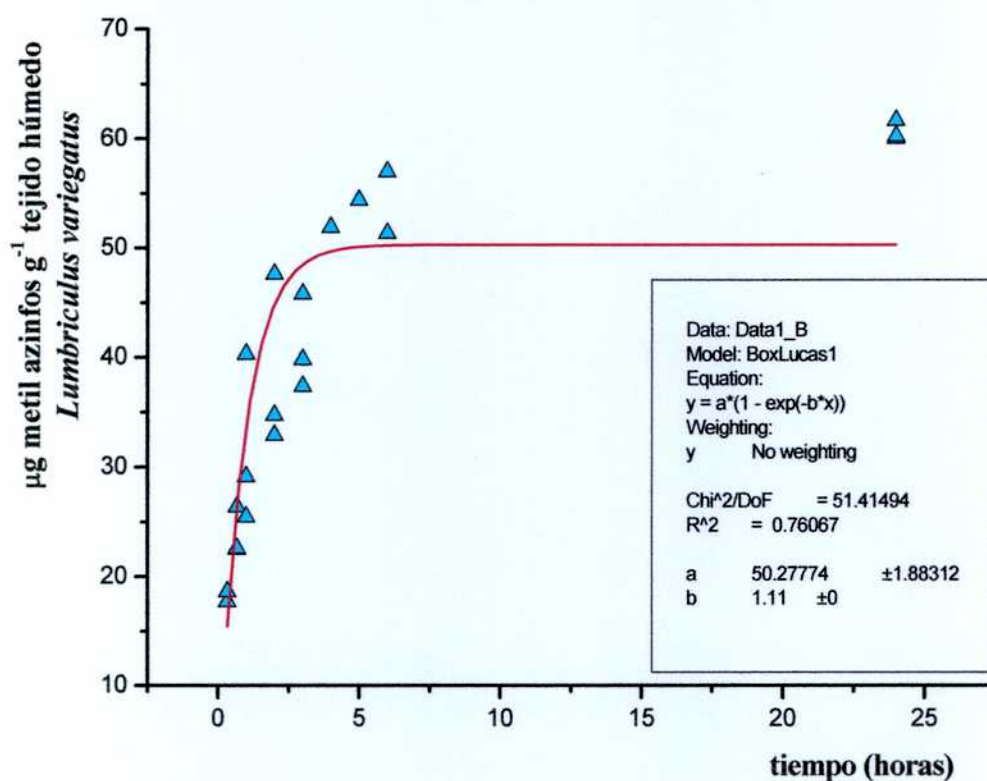


Figura 3.16: Toxicocinética del metil azinfos en *L. variegatus*. La línea continua muestra el modelo experimental ajustado

La Tabla 3.3 resume los resultados toxicocinéticos en ambas especies de invertebrados expuestas a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos, según los modelos cinéticos teóricos y experimentales.

Tabla 3.3: Toxicocinética comparada en *B. glabrata* y *L. variegatus*

Invertebrado	Modelo cinético teórico			Modelo cinético experimental		
	k_1 ($\text{ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	k_2 (h^{-1})	FBC_{cin} (ml g^{-1})	k_1 ($\text{ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	k_2 (h^{-1})	FBC_{cin} (ml g^{-1})
<i>B. glabrata</i>	$6,56 \pm 0,13$	$0,76 \pm 0,04$	$8,63 \pm 0,17$	$5,58 \pm 0,14$	$0,62 \pm 0,05$	$9,00 \pm 0,19$
<i>L. variegatus</i>	$7,71 \pm 0,35$	$0,70 \pm 0,10$	$11,01 \pm 0,45$	$11,16 \pm 0,16$	$1,11 \pm 0,03$	$10,05 \pm 0,19$

3.4 Separación y cuantificación del metil azinfos oxón

La Figura 3.17 representa el cromatograma de una solución patrón de metil azinfos oxón disuelto en fase móvil: acetonitrilo-agua (45:55 V/V), es decir, en las mismas condiciones cromatográficas que las desarrolladas para el metil azinfos. El tiempo de retención para el oxón derivado fue de aproximadamente 17 minutos, con un área de 2.084.786. El cromatograma elegido corresponde a una dilución de la solución patrón de $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metil azinfos oxón.

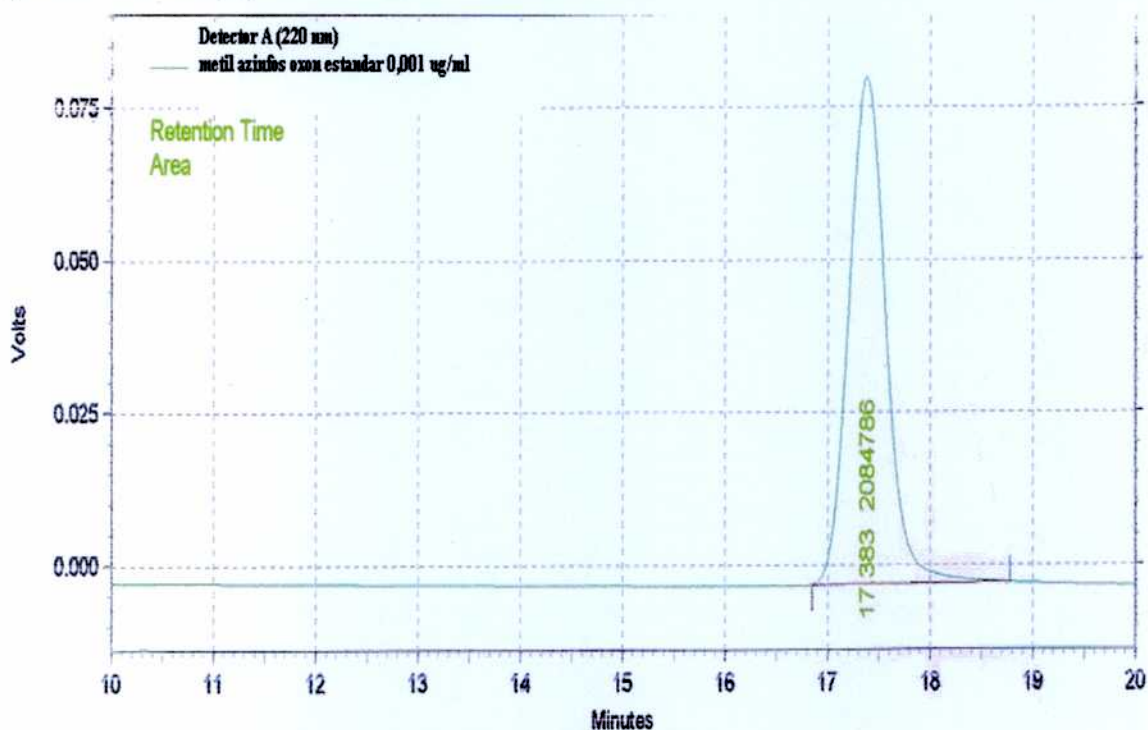


Figura 3.17: Cromatograma del metil azinfos oxón

Las Figuras 3.18 a, b y c representan el espectro de absorción del metil azinfos oxón entre 190 y 370 nm, su primera y segunda derivada, respectivamente. La identificación del compuesto se realizó considerando su tiempo de retención y la similitud de los barridos espectrales.

La comparación de los barridos espectrales del metil azinfos y su oxón derivado demuestran en este último un desplazamiento hipsocrómico, es decir con máximos de absorción a longitudes de onda menores como consecuencia del reemplazo en la molécula del metil azinfos de un átomo de azufre por el oxígeno. En este caso, el máximo de absorción se presenta a 212 nm. No obstante, la absorción a 220 nm es importante, por lo que se trabajó con ambos compuestos a esta longitud de onda.

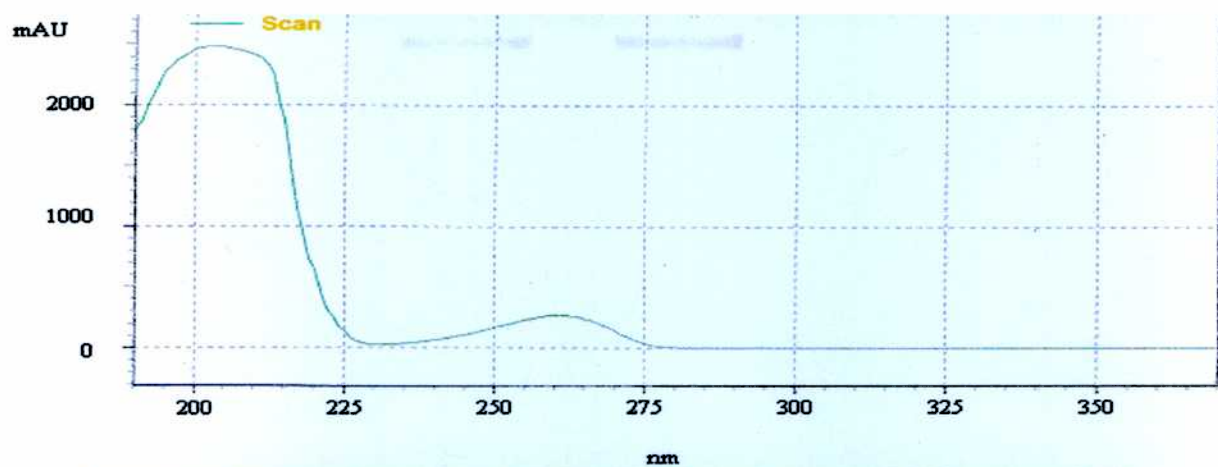


Figura 3.18 a: Barrido espectral del metil azinfos oxón en acetonitrilo-agua (45:55 V/V)

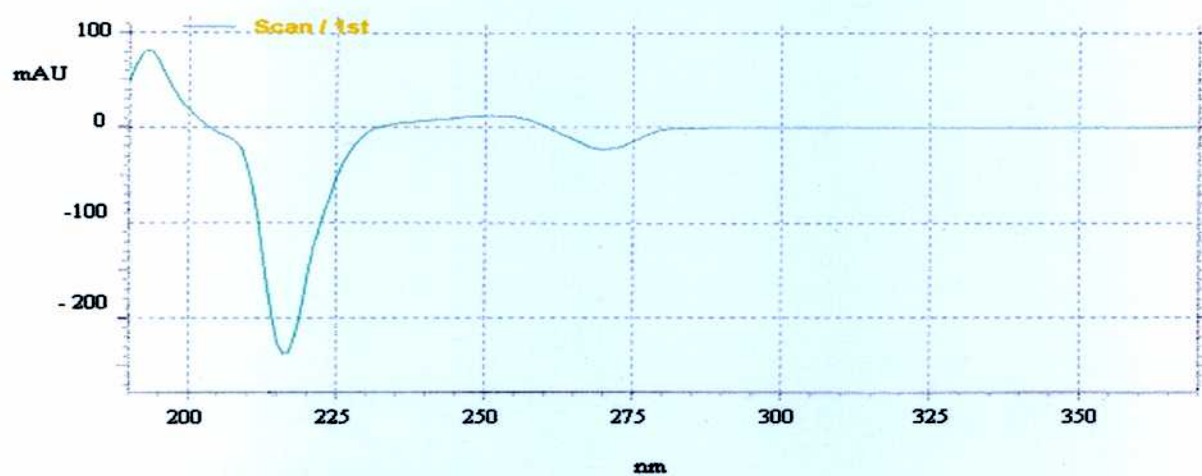


Figura 3.18 b : Primera derivada

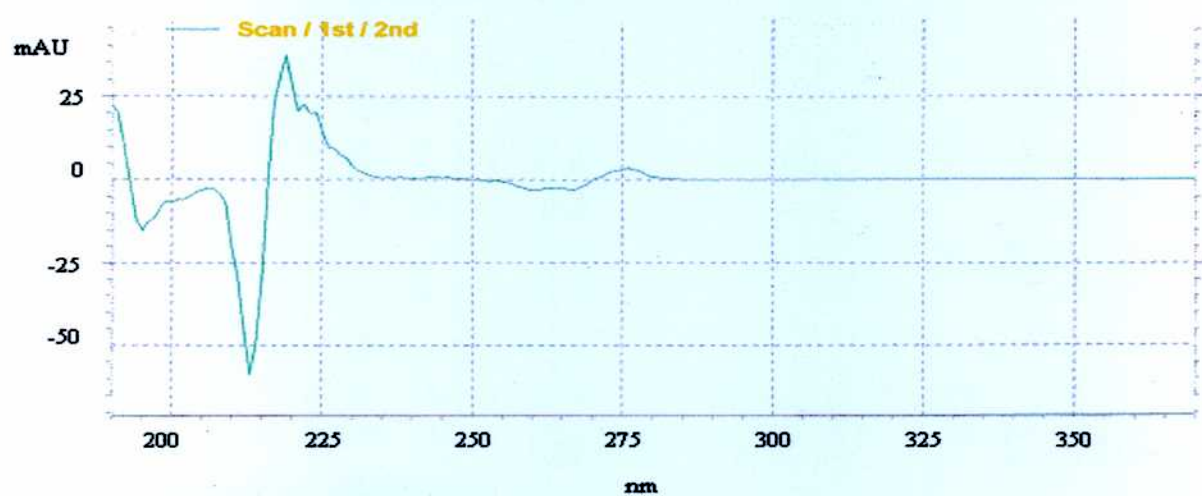


Figura 3.18 c: Segunda derivada

3.4.1 Curva de calibración del metil azinfos oxón

La Figura 3.19 es la representación gráfica de las áreas promedio obtenidas luego de las corridas cromatográficas de una solución patrón de metil azinfos oxón.

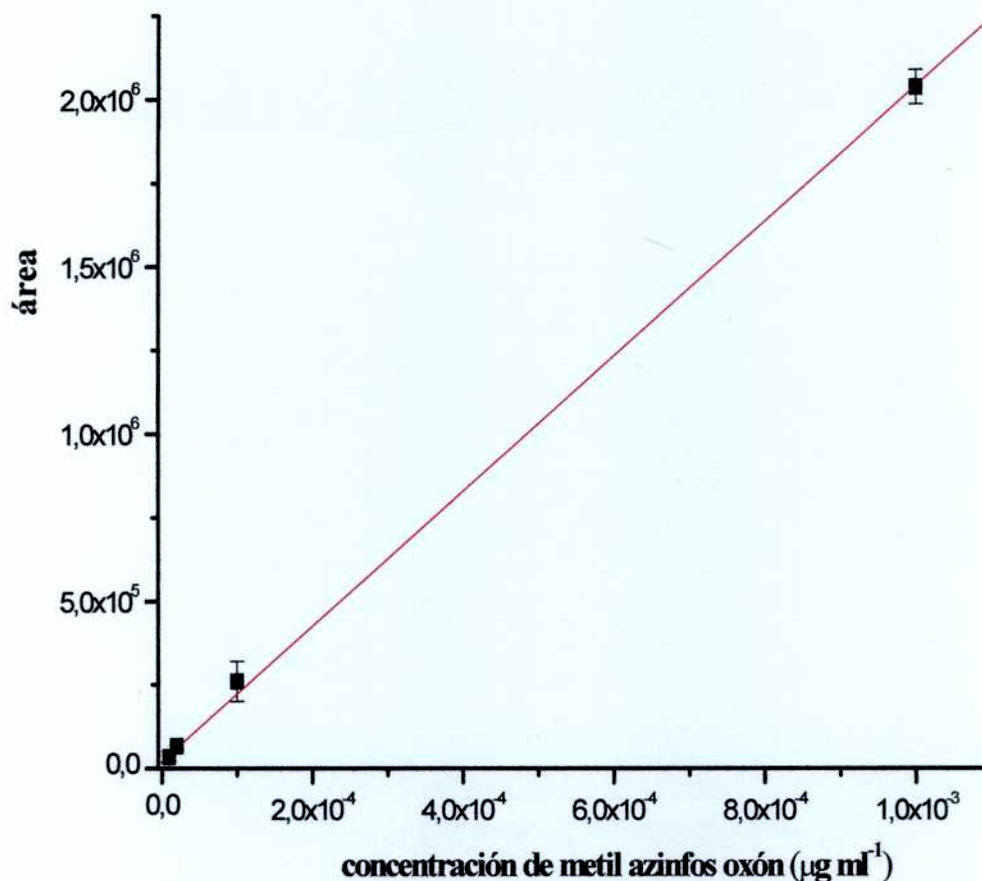


Figura 3.19: Gráfico del área en función de la concentración de metil azinfos oxón ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

El análisis de linealidad se realizó en un rango de concentraciones comprendido entre $1 \times 10^{-5} \mu\text{g ml}^{-1}$ y $1 \times 10^{-3} \mu\text{g ml}^{-1}$. El número de puntos utilizados para efectuar la curva de calibración fue de cuatro. Para cada nivel se usaron cinco determinaciones independientes, se calculó el área promedio y su desviación estándar.

Las muestras analizadas se prepararon por dilución de una solución madre que contenía $1 \mu\text{g}$ de metil azinfos oxón por cada mililitro de una mezcla de acetonitrilo-agua (45:55 V/V), realizadas el mismo día del análisis. A partir de dichos resultados se determinó la siguiente recta de regresión por el método de los cuadrados mínimos:

3. Resultados

$$\text{Área} = y = mx + b$$

$$\text{Área} = 2,02288 \times 10^9 \times (\mu\text{g ml}^{-1}) + 19.083,25$$

El coeficiente de correlación fue:

$$R = 0,99967$$

$$n = 4$$

A diferencia del metil azinfos, el oxón derivado mostró una respuesta lineal sólo en soluciones muy diluidas. No obstante lo expuesto, la sensibilidad del método fue mucho mayor para el oxón derivado. La relación de las pendientes de las rectas de regresión de ambos compuestos resultó $1,7 \times 10^4$ veces mayor para el metil azinfos oxón.

El estándar analítico adquirido del metil azinfos oxón consistía en una ampolla de vidrio de color caramelo conteniendo una solución diluida del mismo en tolueno ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Debido a la volatilidad del solvente y las sucesivas diluciones que debían hacerse del mismo en etanol absoluto para los bioensayos, o en acetonitrilo para las corridas cromatográficas, luego de la apertura de la ampolla, se procedió inmediatamente a desarrollar el método analítico de cuantificación del oxón. De manera rutinaria las soluciones diluidas en etanol fueron controladas en su concentración antes y después de los bioensayos.

3.5 Inhibición *in vitro* de la actividad ChE por metil azinfos y metil azinfos oxón

3.5.1 Actividad ChE en los sobrenadantes de homogenatos de *B. glabrata* en función de la concentración de metil azinfos

Con el objeto de demostrar que el metil azinfos “*per se*” no tiene acción inhibitoria sobre las ChEs, diferentes concentraciones del mismo fueron incubadas con los sobrenadantes de los homogenatos de *B. glabrata*. Hasta la concentración de 480 $\mu\text{g ml}^{-1}$ no se observó inhibición alguna de la actividad ChE. Esta concentración es unas 100 veces superior a la CI_{50} determinada en los bioensayos de exposición por 48 horas de *B. glabrata* al metil azinfos. Sin embargo, una fuerte inhibición del 58% con respecto al control se comprobó a la concentración de 960 $\mu\text{g ml}^{-1}$, pero también cambiaron las propiedades de los homogenatos: una marcada opalescencia consecuencia de desnaturalización proteica y/o falta de solubilidad del pesticida sugieren que esta inhibición, a tan altas concentraciones, es totalmente inespecífica (Figura 3.20).

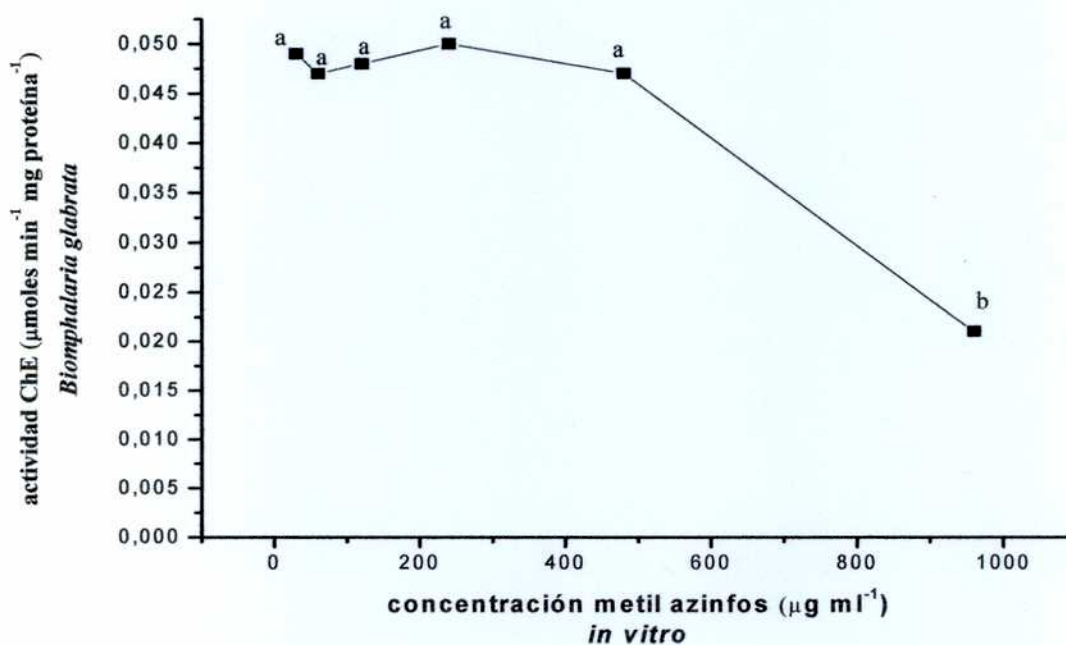


Figura 3.20: Actividad ChE en homogenatos de *B. glabrata* expuestos a diferentes concentraciones de metil azinfos. La actividad ChE fue determinada con AsCh como sustrato. Cada punto representa el promedio $\pm$ D.E. de al menos 3 determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a $p < 0,05$

3. Resultados

3.5.2 Actividad ChE *in vitro* en *B. glabrata* en función de la concentración de metil azinfos oxón

Los valores de actividad ChE en el sobrenadante de los homogenatos de *B. glabrata* incubados durante 15 minutos con distintas concentraciones de metil azinfos oxón, se muestran en la Figura 3.21. Una inhibición enzimática dependiente de la concentración pudo ser detectada al utilizar la forma biológicamente activa del pesticida, es decir, el metil azinfos oxón.

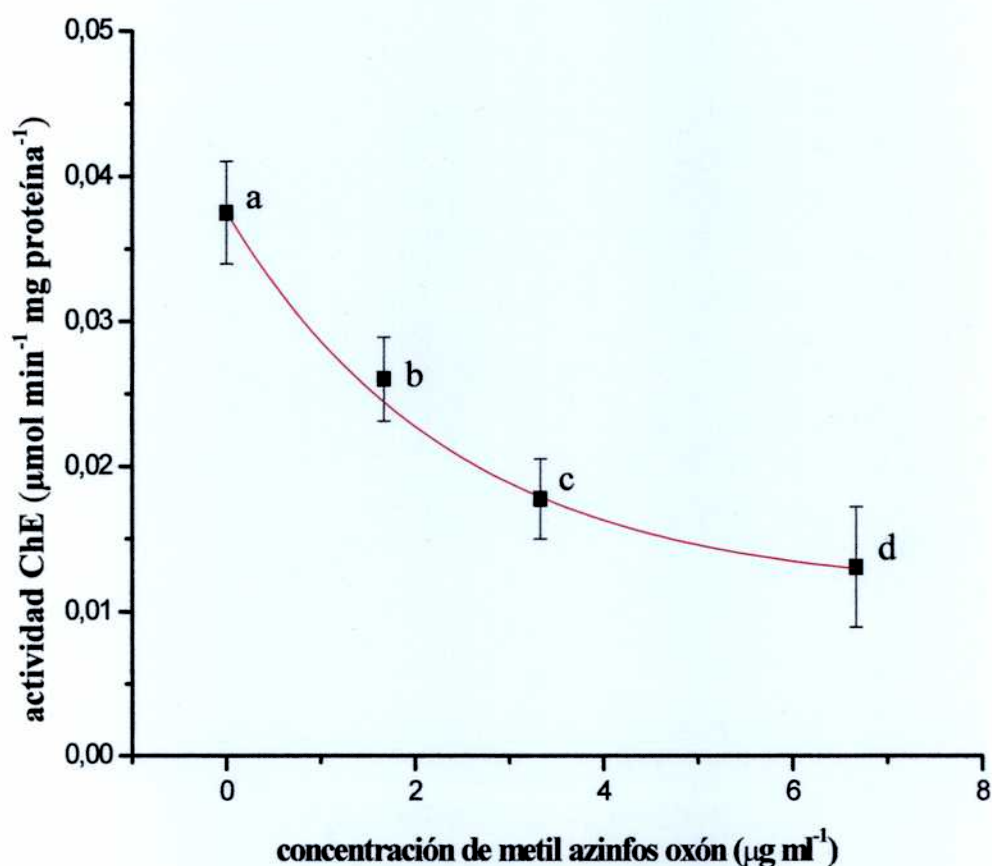


Figura 3.21: Actividad ChE en homogenatos de *B. glabrata* expuestos a diferentes concentraciones de metil azinfos oxón. La actividad ChE fue determinada con AsCh como sustrato. Cada punto representa el promedio $\pm$ D.E. de al menos 3 determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a $p < 0,05$

3. Resultados

3.5.2.1 Cálculo de la CI_{50}

Para el cálculo de la CI_{50} se utilizó el método Probit. El probit es una unidad de probabilidad obtenida añadiéndole 5 a la desviación normal de una distribución normal estandarizada de resultados de un estudio dosis-respuesta; al sumarle un valor de 5 se elimina la complicación de manejar valores negativos. Una representación gráfica probit frente al logaritmo de la concentración, da una recta si la distribución de la respuesta es de tipo logarítmica normal. La CI_{50} se calcula al trazar una vertical desde el punto de la recta en la cual la unidad probit es de 5 (inhibición del 50% de la actividad ChE).

La concentración de metil azinfos oxón requerida para causar *in vitro* un 50% de la inhibición de la actividad ChE en *B. glabrata* y el intervalo de confianza del 95% resultó ser de 3,82 (2,17-10,68) $\mu\text{g ml}^{-1}$.

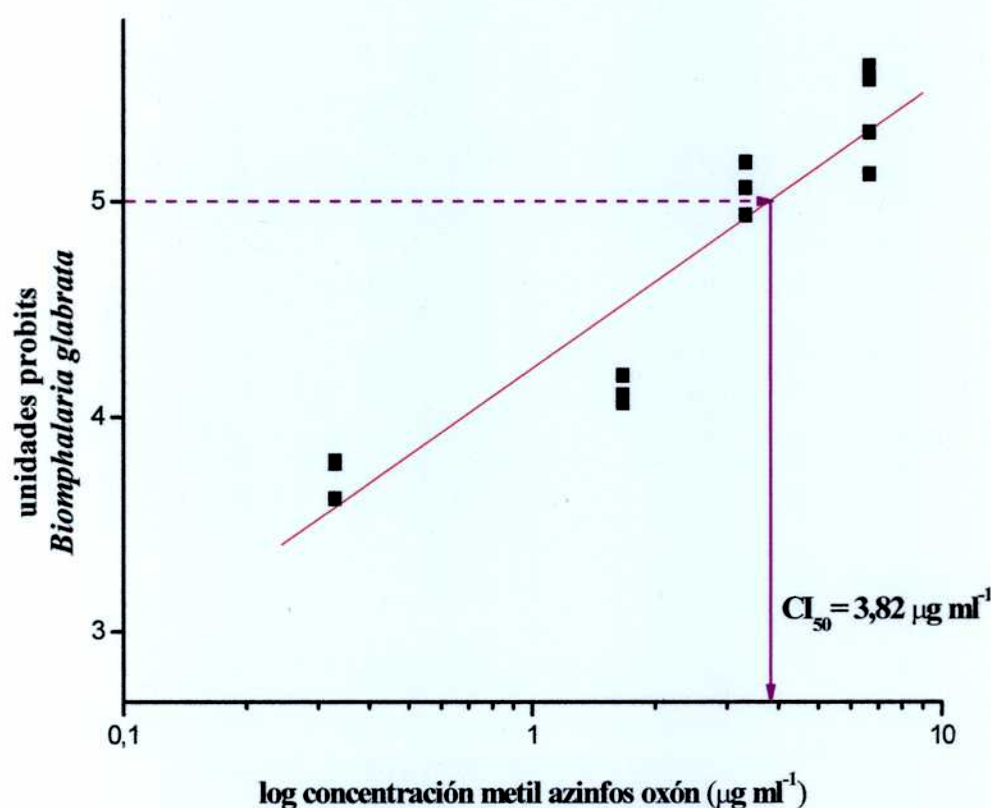


Figura 3.22: Transformación lineal de los datos de la Figura 3.21 cuando el logaritmo decimal de la concentración de metil azinfos oxón utilizada se compara con el porcentaje de la inhibición *in vitro* de la ChE, en *B. glabrata*, en unidades probit

3. Resultados

3.5.3 Actividad ChE *in vitro* en *L. variegatus* en función de la concentración de metil azinfos oxón

Los valores de actividad ChE en el sobrenadante de los homogenatos de *L. variegatus* incubados durante 15 minutos con distintas concentraciones de metil azinfos oxón, se ilustran en la Figura 3.23. En el caso de *L. variegatus*, la CI_{50} (Figura 3.24) y el intervalo de confianza del 95% fueron: 0,0025 (0,0020-0,0030) $\mu\text{g ml}^{-1}$.

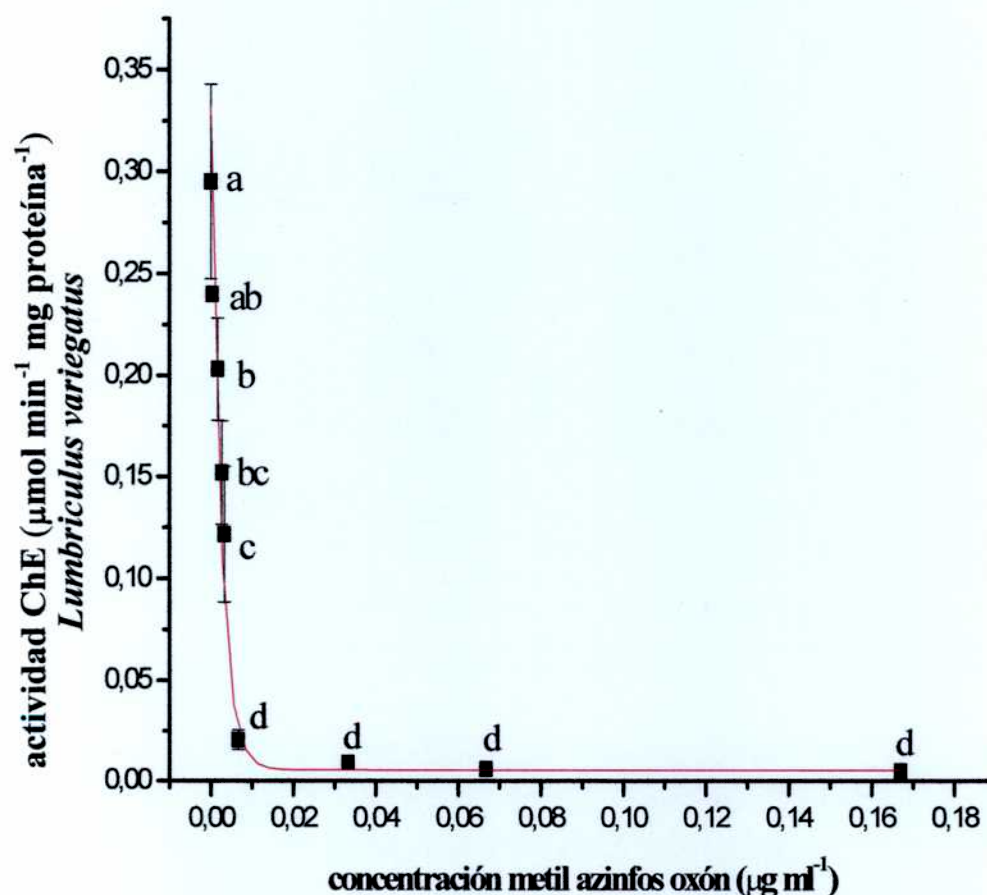


Figura 3.23: Actividad ChE en homogenatos de *L. variegatus* expuestos a diferentes concentraciones de metil azinfos oxón. La actividad ChE fue determinada con AsCh como sustrato. Cada punto representa el promedio $\pm$ D.E. de al menos tres determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a $p < 0,05$

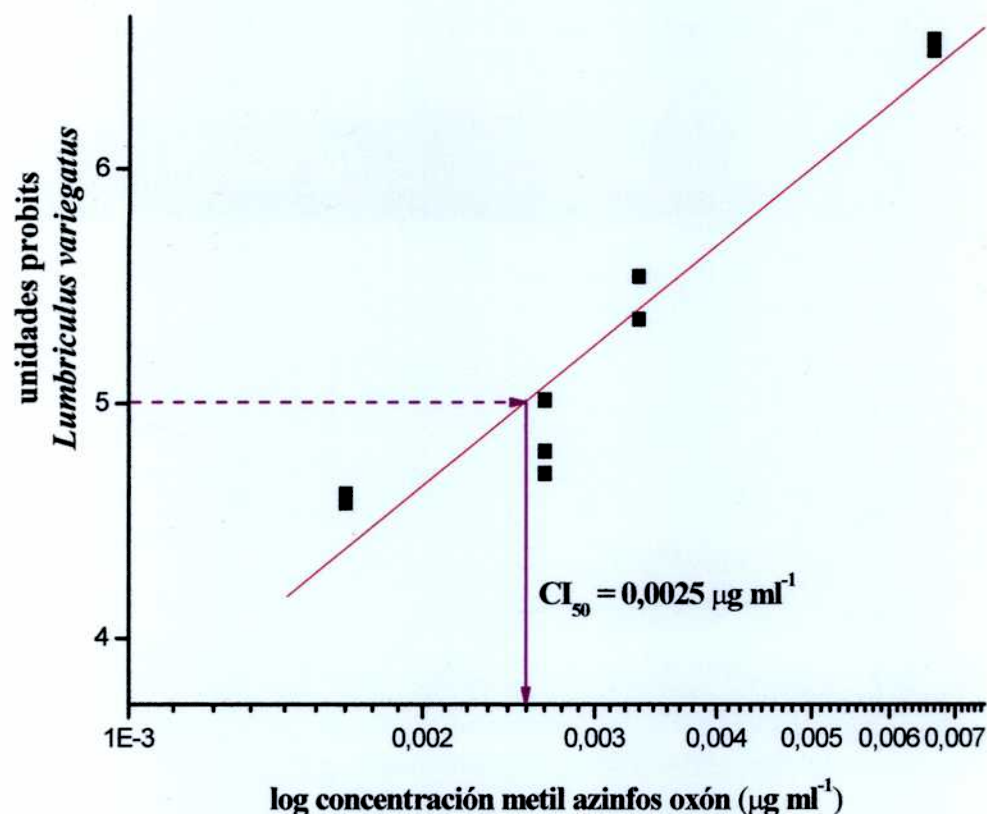
3.5.3.1 Cálculo de la CI_{50} 

Figura 3.24: Transformación lineal de los datos de la Figura 3.23 cuando el logaritmo decimal de la concentración de metil azinfos oxón utilizada se compara con el porcentaje de la inhibición *in vitro* de la ChE, en *L. variegatus*, en unidades probit

Como vemos, en los homogenatos de ambas especies se observó una inhibición enzimática dependiente de la concentración del metil azinfos oxón. Sin embargo, *L. variegatus* fue mucho más sensible que *B. glabrata* a la inhibición de la actividad ChE *in vitro* inducida por el metil azinfos oxón. Es decir que, para producir el 50% de inhibición enzimática en ambas especies, el oligoqueto *L. variegatus* resultó ser unas 1500 veces más sensible al metil azinfos oxón que el gastrópodo, *B. glabrata*.

4. *Discusión*

4. Discusión

En este trabajo desarrollamos y validamos un método simple y preciso para la detección y cuantificación del insecticida organofosforado metil azinfos, en muestras de agua contaminadas con el pesticida y en las matrices biológicas de *B. glabrata* y *L. variegatus* expuestas a este organofosforado. El método resultó específico para la cuantificación del metil azinfos en estas matrices biológicas pues, al tiempo de retención de este compuesto, no se observó ningún tipo de interferencia. Además, el método probó ser lo suficientemente sensible para poder llevar a cabo los bioensayos de toxicocinética.

A pesar de que los métodos desarrollados por cromatografía gaseosa para cuantificar pesticidas organofosforados son mucho más sensibles que la cromatografía líquida de alta performance, también es cierto que requieren un tratamiento más exhaustivo de las muestras, con extracciones en fase sólida y recuperación de los analitos con solventes orgánicos. Estas técnicas muchas veces conducen a una deficiente eficiencia de extracción y recuperación y dificultan la factibilidad de ser llevados a cabo de manera rutinaria por lo expuesto y por sus altos costos. Más aún, ambos, el metil azinfos y el metil azinfos oxón son térmicamente lábiles (Liang y Lichtenstein, 1972) y no pueden ser analizados por métodos que requieran alta temperatura. Según estos autores, esto elimina la posibilidad de utilizar el método de cromatografía gaseosa para la determinación cuantitativa. En un estudio preliminar, Lin y col. (1980), investigaron por GC/MS las propiedades del metil azinfos y del metil azinfos oxón y encontraron que ambos compuestos se descomponían en el inyector (250 °C) y en el separador (250 °C) del sistema GC/MS. Estos autores encontraron, en un ensayo *in vitro* utilizando homogenatos de hígado de rata para estudiar el perfil metabólico del metil azinfos que, el mismo, se descomponía cuando la mezcla era calentada en agua hirviendo por cinco minutos. Además, extraían al metil azinfos y su oxón derivado a partir del homogenato dos veces con acetato de etilo. Luego de la centrifugación, el sobrenadante orgánico era tratado con una corriente de nitrógeno y el acetato de etilo se evaporaba a sequedad. El residuo se retomaba con acetonitrilo y se inyectaba en un equipo de HPLC, fase normal, acoplado a un espectrómetro de masa. Estos antecedentes nos permitieron adaptar esta técnica cromatográfica utilizando, en nuestro caso, una fase reversa C18 y seleccionando finalmente la fase móvil constituida por acetonitrilo-agua (45:55 V/V). El trabajo de Lin y col. (1980) sirvió de base para desarrollar, de manera similar, la técnica de extracción del organofosforado a partir de las matrices biológicas. Con nuestro procedimiento demostramos que dos extracciones con acetato de etilo

4. Discusión

garantizaban en los homogenatos adicionados con cantidades conocidas del pesticida, una eficiencia de extracción promedio del metil azinfos del 99%, en ambas matrices biológicas. Más aún, durante la puesta a punto de la técnica se intentó evaporar a sequedad el acetato de etilo con temperatura constante de 50 °C. La misma, fue suficientemente alta para alterar los cromatogramas y no poder detectar al metil azinfos, probablemente por haberse descompuesto térmicamente y/o volatilizado. Estos resultados nos llevaron a tomar la decisión de evaporar el solvente orgánico únicamente en corriente de nitrógeno, a temperatura ambiente, y casi a sequedad, para ser retomado finalmente en acetonitrilo previo a la inyección en el cromatógrafo.

El método cromatográfico desarrollado fue útil para cuantificar también el metil azinfos oxón en solución. La respuesta con el oxón fue lineal en soluciones muy diluidas, a diferencia del metil azinfos, que presentó una respuesta lineal en un rango de concentraciones más amplio. Sin embargo, con el método cromatográfico utilizado la sensibilidad fue $1,7 \times 10^4$ veces mayor para el oxón que para el metil azinfos. Esta alta sensibilidad del método para detectar el oxón a concentraciones del orden de $1 \times 10^{-5} \mu\text{g ml}^{-1}$ fue tomada especialmente en cuenta con el objeto de evidenciar su presencia, por desulfuración metabólica del metil azinfos, luego de la exposición de los organismos al pesticida. El oxón derivado mostró mayor afinidad por la fase estacionaria de C18 que el metil azinfos, con un tiempo de retención de aproximadamente 17 minutos, coincidente con una interferencia que aparece en los controles negativos de ambos invertebrados (ver Figura 3.5), lo que indicaría que el método no es específico para cuantificar el oxón a partir de los homogenatos. Si bien esto es cierto, el área de la señal interferente es pequeña y relativamente constante (por similitud de la cantidad de biomasa utilizada para obtener cada homogenato), por lo que si se hubiera extraído de los homogenatos (expuestos hasta 96 horas con metil azinfos) la forma biológicamente activa producida por biotransformación, aun en cantidades del orden de ng ml^{-1} , hubiera producido cambios en el área interferente de varios ordenes de magnitud. No obstante, esto no ocurrió, lo que sugiere que el oxón formado presenta una alta reactividad, fosforilando (y así, degradándose rápidamente) a las ChEs y a otras esterasas. Estos oxones no sólo son potentes inhibidores de AChE en los sitios blanco (por ejemplo, en las sinapsis y uniones neuromusculares), sino también potentes inhibidores de otras serino esterasas, tales como colinesterasas presentes en tejidos no blanco. Las alilesterasas (carboxilesterasas) son serino esterasas de función fisiológica desconocida que pueden tener un rol protector durante la intoxicación por organofosforados

4. Discusión

(Chambers y col., 1990; Maxwell, 1992). La fosforilación de estas esterasas no blanco destruyen estequiométricamente una parte del oxón y previenen que una fracción del mismo inhiba a la enzima blanco, la AChE (Atterberry y col., 1997a y b). La gran sensibilidad de las alilesterasas a la inhibición por paraoxón, clorpirifos oxón, y el metil azinfos oxón, comparado a la AChE, sugieren que ellas deberían ser eficientes trampas de oxón (Chambers y col., 1990).

La constancia de la concentración del metil azinfos en la solución acuosa fue demostrada en los estudios de estabilidad llevados a cabo en distintos tipos de materiales. Se observa en la mayoría de las publicaciones internacionales una carencia importante en los estudios de estabilidad, de sorción y de volatilización de los pesticidas que utilizan en sus bioensayos. Estos estudios previos deberían realizarse siempre para comprender el comportamiento del pesticida en la columna de agua antes de interaccionar con los organismos. En este sentido, en un trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio (datos no presentados) con otro fosforotioato, el clorpirifos, demostramos que presenta una gran adsorción a todos los materiales plásticos ensayados, llegando incluso a no poder detectarse en pocas horas en la columna de agua. Es más, enjuagado dicho material con agua destilada y luego retomando de las paredes del recipiente con acetonitrilo es posible extraer con este solvente orgánico cantidades muy grandes del clorpirifos adsorbido a dicho material. En cambio, en recipientes de vidrio, el fenómeno de sorción ocurre levemente. Por otro lado, se observa una merma importante del clorpirifos dentro de las 24 horas en recipientes en contacto directo con la atmósfera, no así en recipientes tapados, lo que marca una importante pérdida por volatilización. Como vemos, compuestos químicamente emparentados presentan un comportamiento muy diferente.

Se comprobó experimentalmente la constancia de la concentración del metil azinfos durante el tiempo de duración de los bioensayos. Si bien los organismos bioconcentran y metabolizan al pesticida, la biomasa expuesta es despreciable frente al volumen de la solución (peceras de plástico conteniendo 600 ml de solución acuosa con $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos).

Nuestro trabajo llevado a cabo con *L. variegatus* y *B. glabrata* tuvo como objetivo principal determinar los parámetros toxicocinéticos comparados entre las dos especies expuestas a una columna de agua contaminada con metil azinfos, es decir, comparar las cinéticas de absorción y eliminación del pesticida y evaluar la capacidad de bioconcentración. Otro objetivo esencial de nuestra investigación fue relacionar los

4. Discusión

parámetros toxicocinéticos de ambas especies con procesos toxicodinámicos relacionados, en particular, con la inhibición de la actividad ChE.

En trabajos previos de nuestro grupo se determinaron las CI_{50} de la actividad ChE en *B. glabrata* y *L. variegatus*. Los valores obtenidos correspondieron a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para los gastrópodos y $0,006 \mu\text{g ml}^{-1}$ para los oligoquetos. Con el objeto de que los estudios toxicocinéticos pudieran ser comparables en ambas especies, la concentración elegida del pesticida en el agua para los estudios de bioconcentración fue la correspondiente a la CI_{50} de la actividad ChE en *B. glabrata*, es decir, de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Con nuestro método, el límite de detección fue unas 90 veces menor a dicha concentración y el límite de cuantificación en medio acuoso de $0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se trabajó en un sistema estático debido a la constancia de la concentración del metil azinfos en la columna de agua durante la etapa de exposición.

El modelo cinético unicompartimental de primer orden seleccionado resultó útil para calcular las constantes de absorción, k_1 , y las constantes de eliminación, k_2 , en ambas especies. En *B. glabrata* y *L. variegatus*, los valores de k_2 (h^{-1}) del compuesto parental fueron, respectivamente, de 0,62 y 1,11 en los tejidos blandos totales. De esta manera, durante la depuración, la vida media del metil azinfos fue de 67 min para el gastrópodo y de 37 min para el oligoqueto, lo que indicó una rápida eliminación del pesticida en estos invertebrados. En el caso del oligoqueto aproximadamente el 90% del compuesto parental fue eliminado a las 2 horas de depuración; no obstante, se pudo cuantificar por última vez, a las 24 horas de depuración, unos $0,37 \mu\text{g g}^{-1}$ de metil azinfos en *L. variegatus*. Nikkilä y col. (2003) observaron el mismo comportamiento en *L. variegatus* al utilizar pentaclorofenol en sus estudios toxicocinéticos: una muy rápida velocidad de depuración dentro de las 12 horas seguida de una más lenta eliminación entre las 12 y 72 horas. Estos autores postularon que la depuración del pentaclorofenol, como la de muchos otros xenobióticos, es un fenómeno multifásico con dos fases claramente observables, una primera eliminación muy rápida, seguida de otra mucho más lenta.

Nuestros resultados toxicocinéticos presentaron similitudes con los estudios de bioconcentración efectuados con carbamatos y organofosforados en otras especies. En este sentido, Ramírez Mora y col. (2000) estudiaron las relaciones entre la toxicocinética del inhibidor reversible de la ChE, el carbaril, y los efectos sobre la actividad AChE en el caracol *Pomacea patula*. Estos investigadores observaron que al transferir los caracoles en agua libre del pesticida, luego de 72 horas de exposición, la

4. Discusión

eliminación del carbaril podía ser explicada mediante un modelo cinético unicompartmental y ocurría rápidamente con una vida media de 1 hora, con una eliminación del 99% del compuesto parental luego de 7 horas de depuración.

De Bruijn y col. (1993) ajustaron la eliminación del fenitrothion bioconcentrado en el pez *Poecilia reticulata* a un modelo cinético unicompartmental de primer orden, en este caso con una k_2 de $0,047 \text{ h}^{-1}$ para este insecticida en el cuerpo total, indicando que la eliminación había sido rápida. Si bien estos resultados son de un orden de magnitud menor a los hallados por nosotros, esto se podría deber, entre otras causas, a diferencias interespecies; menores concentraciones de exposición y a la mayor lipofilicidad del fenitrothion ($\log K_{ow} = 3,32$) con respecto a la del metil azinfos ($\log K_{ow} = 2,75$). No obstante, la eliminación es rápida, con un tiempo de vida media del fenitrothion de 14,7 h. Más aún, estos autores sugirieron que la biotransformación *in vivo* ocurría relativamente más lentamente que la eliminación del compuesto parental. Sancho, y col. (1998) estudiaron la toxicocinética del insecticida organofosforado fenitrothion en *Anguilla anguilla*. Estos investigadores observaron que el estado estacionario aparente se alcanzaba aproximadamente a las dos horas cuando los animales fueron expuestos a una concentración de $0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$ del pesticida. En coincidencia con nuestros resultados, también observamos que a la concentración de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos, se alcanzó rápidamente un estado estacionario aparente entre las 4 y 5 horas para ambas especies. En esa misma especie, Sancho y col. (1998) observaron durante la fase de depuración, que los animales eliminaban rápidamente al pesticida acumulado; las constantes de eliminación, $k_2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ fueron de 0,06 y 0,04 en exposiciones a $0,02$ y $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$. En ambos experimentos los tiempos de vida media del fenitrothion en el tejido muscular fueron menores a las 24 horas. Otros autores (Tsuda y col., 1989, 1990; Sancho y col, 1994b) encontraron también una rápida acumulación de este pesticida en peces. De manera similar, Tsuda y col. (1995) observaron que el fenitrothion, diazinon, y fention eran rápidamente acumulados en los tejidos de *Oryzias latipes* luego de 12 horas de exposición. Estos autores observaron que la eliminación del fenitrothion no estaba influenciada por la presencia del tóxico en una mezcla con otros insecticidas organofosforados a los cuales *O. latipes* había sido expuesto; de hecho, la acumulación y la eliminación de este tóxico en la mezcla pudo ser evaluada a partir de los datos de los estudios efectuados por separado y en ambos casos la eliminación pudo ser asumida por un proceso cinético unicompartmental de primer orden con valores de k_2 de $0,17 \text{ h}^{-1}$ y $0,14 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Además, estos investigadores postularon que

4. Discusión

la absorción del fenitrothion a través de la epidermis podía conducir a absorción por la dermis y al músculo. El mecanismo de absorción a través de la epidermis fue reportado en la anguila europea (Larson y col., 1991; Sancho y col., 1994a, b y 1996). Tsuda y col. (1989) encontraron que se alcanzaba un rápido estado estacionario con el fenitrothion en la totalidad del cuerpo del pez *Gnathopogon caerulescens*. La absorción del metil azinfos por la epidermis podría ser uno de los mecanismos de ingreso tanto en *L. variegatus* como en *B. glabrata*, favorecida dicha difusión pasiva por la relativa lipofiliidad del metil azinfos. En los dos modelos toxicocinéticos utilizados se observó una mayor velocidad de absorción en el oligoqueto, pero fue en el modelo cinético experimental donde se evidenció una velocidad de absorción del xenobiótico unas dos veces superior en *L. variegatus* que en *B. glabrata*, con valores de k_1 de $11,16 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $5,58 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Esta mayor velocidad de absorción en el oligoqueto podría deberse, en parte, a la exposición total del cuerpo de *L. variegatus* en la columna de agua contaminada. En cambio, *B. glabrata* presenta una caparazón de matriz proteica y calcárea que podría proteger parte de sus órganos a una exposición completa, contando además, con la posibilidad de llenar alternativamente con aire o agua su pulmón, y hacer incursiones en la interfase entre el líquido y el aire. Estas diferencias anatómicas y de comportamiento podrían explicar parcialmente esa menor velocidad de absorción en el gastrópodo. No obstante, la absorción fue muy rápida en ambas especies. Más aún, hasta las primeras dos horas de absorción, *B. glabrata* presentó concentraciones altas y relativamente constantes de metil azinfos en su hemolinfa, con valores promedio de $3,66 \mu\text{g ml}^{-1}$ (datos no mostrados). Esta concentración en la hemolinfa, ligeramente inferior a la concentración de exposición, sugiere también un rápido mecanismo de absorción y de distribución del metil azinfos desde la hemolinfa hacia los tejidos. De la misma manera, Ramírez Mora y col. (2000) pudieron verificar en el caracol *Pomacea patula* una rápida fase de absorción del carbaryl desde el agua a la hemolinfa, y luego una distribución gradual del xenobiótico a los tejidos, con una rápida bioconcentración en la glándula digestiva, que se correlacionaba probablemente con una gran irrigación sanguínea de dicho órgano.

Los factores de bioconcentración son comúnmente relacionados al contenido de lípidos de los organismos debido a que la bioacumulación de sustancias hidrofóbicas es altamente dependiente a menudo de la partición en los lípidos (Schmieder y col., 1995). Nuestros resultados mostraron FBC_{cin} similares en ambos organismos, pero fueron ligeramente superiores en *L. variegatus* que en *B. glabrata*. La tendencia a una mayor

4. Discusión

bioconcentración en el oligoqueto quedó perfectamente ilustrada en el modelo cinético teórico. En el mismo se utilizaron exclusivamente todos los datos obtenidos durante la fase de exposición. De esta manera se verificó una mayor correlación con el $FBC = C_{org}/C_w$ en el estado estacionario y el $FBC_{cin} = k_1/k_2$ calculado por dicho modelo, pues tiene en cuenta todos los datos experimentales de la fase de absorción y del estado estacionario. De esta manera, los FBC_{cin} para *B. glabrata* y *L. variegatus* fueron de $8,63 \text{ ml g}^{-1}$ y $11,01 \text{ ml g}^{-1}$, respectivamente. Es decir, el oligoqueto presentó un factor de bioconcentración un 28 % mayor que el gastrópodo. Esto podría explicarse, en parte, a diferencias en el metabolismo y en el contenido de lípidos presentes en ambos invertebrados.

Kristoff y col. (2006) efectuaron una caracterización parcial de la actividad ChE en los homogenatos obtenidos a partir de los tejidos blandos de los invertebrados de agua dulce *B. glabrata* y *L. variegatus*. El uso de la totalidad de tejidos blandos en el caracol fue necesario para permitir comparaciones directas con *L. variegatus*, dado que en estas lombrices las regiones anatómicas no se distinguen fácilmente debido al pequeño tamaño de estos oligoquetos. Demostraron que utilizando AsCh como sustrato, *B. glabrata* presentaba actividad ChE en los sobrenadantes de $11.000 \times \text{g}$; la actividad ChE en *L. variegatus* en los sobrenadantes fue varias veces superior a la encontrada en *B. glabrata*. Por otro lado, encontraron inhibición por exceso de sustrato en ambos organismos, con un máximo de inhibición en los oligoquetos a concentraciones de $33,6 \text{ mM}$ de AsCh. Además, al utilizar el inhibidor selectivo de ChEs, la eserina, demostraron que un porcentaje menor de la actividad enzimática podía deberse a otras esterasas diferentes a las ChEs. En base a estos resultados previos se decidió efectuar los ensayos de inhibición de la actividad ChE *in vitro* por acción del metil azinfos oxón trabajando con los sobrenadantes de $11.000 \times \text{g}$ de los homogenatos de ambas especies y utilizando como sustrato AsCh a la concentración de $0,75 \text{ mM}$ donde se presentaba la mayor actividad enzimática.

Varios autores coinciden en postular que los oxón derivados son, *in vitro*, más potentes inhibidores de la AChE que los compuestos parentales por lo menos en tres órdenes de magnitud (Forsyth y Chambers, 1989; Chambers y Chambers, 1989). El metil azinfos es un insecticida que contiene un grupo fosforotioato. Así, el compuesto parental necesitaría formar el oxón derivado para inhibir a la enzima ChE. Con el objeto de demostrar que el metil azinfos oxón era el responsable de la inhibición de las ChEs procedimos a efectuar los ensayos *in vitro* en ambas especies de invertebrados.

4. Discusión

Previamente demostramos que el metil azinfos *per se* no tiene acción inhibitoria *in vitro* hasta la concentración de $480 \mu\text{g ml}^{-1}$. Dado que el pesticida utilizado era un estándar y fue cuantificado por HPLC se descartó cualquier tipo de contaminación por el oxón que pudiese estar presente a esas altas concentraciones, como podría llegar a suceder si se utilizara un grado técnico del compuesto, que forma parte de las formulaciones comerciales. Por otro lado, vimos que esa inhibición de la actividad ChE por el metil azinfos, a concentraciones superiores a $480 \mu\text{g ml}^{-1}$, era totalmente inespecífica al modificarse las características fisicoquímicas del homogenato. Xuereb y col. (2007) encontraron un patrón de inhibición *in vitro* por clorpirifos en el crustáceo anfípodo, *Gammarus pulex*, muy similar al hallado por nosotros, es decir, inhibición súbita al pasar de una muy alta concentración de incubación sin inhibición con relación a los controles, a otra donde la inhibición es prácticamente total. Estos autores consideraron por lo tanto que, en condiciones de una alta capacidad de bioconcentración, el clorpirifos *per se* podría inhibir la actividad ChE de *G. pulex in vivo*. Sin embargo, considerando conjuntamente nuestros resultados *in vivo* con los *in vitro* podríamos descartar un efecto inhibitorio *in vivo* del metil azinfos *per se* acumulado en los organismos. Tomando, por ejemplo, el caso de *L. variegatus*, hemos demostrado que exposiciones a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 24 horas (donde la inhibición de la actividad ChE es prácticamente total) condujeron a concentraciones máximas de metil azinfos en los tejidos del oligoqueto del orden de $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido húmedo, es decir, concentraciones que *in vitro* no producen inhibición de la actividad ChE.

Como era de esperar, en los homogenatos de ambos, oligoquetos y gastrópodos, se observó una inhibición enzimática dependiente de la concentración del metil azinfos oxón. Sin embargo, *L. variegatus* fue mucho más sensible que *B. glabrata* a la inhibición de la actividad ChE *in vitro* inducida por el metil azinfos oxón. Es decir que para producir el 50% de inhibición enzimática en ambas especies, el oligoqueto *L. variegatus* resultó ser unas 1500 veces más sensible al metil azinfos oxón que el gastrópodo, *B. glabrata*. Más aún, la inhibición es por fosforilación de un residuo serina del centro activo de la enzima, pues observamos en homogenatos de *B. glabrata* inhibidos con metil azinfos oxón e inmediatamente incubados con clorhidrato de pralidoxima (con el objeto de evitar el envejecimiento de la ChE) por 15 minutos una importante recuperación de la actividad ChE (resultados no presentados). Es decir, la oxima al actuar como un nucleófilo más fuerte que el agua desplaza al fosfato del centro activo, liberando a la enzima y recuperando ésta su actividad.

4. Discusión

Para comparar los resultados obtenidos de las inhibiciones de la actividad ChE por el oxón en nuestros ensayos *in vitro* y los resultados obtenidos por nuestro grupo en bioensayos *in vivo* utilizamos los datos de Kristoff y col. (2006) que determinaron los valores de la actividad ChE en *B. glabrata* y *L. variegatus* por exposición durante 48 horas con diferentes concentraciones de metil azinfos. *In vivo*, también se verificó una inhibición enzimática concentración dependiente detectada en ambas especies. Al igual que los ensayos *in vitro*, *L. variegatus* fue mucho más sensible *in vivo* que *B. glabrata* a la inhibición enzimática inducida por el pesticida.

La Tabla 4.3 muestra las concentraciones de metil azinfos y de metil azinfos oxón requeridas para producir el 50% de inhibición enzimática (CI₅₀), *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Ambos parámetros fueron mucho mayores para *B. glabrata* que para *L. variegatus*, unos tres órdenes de magnitud, y muy similares en ambos tipos de ensayos.

Tabla 4.3: Valores de concentración de metil azinfos y de metil azinfos oxón correspondientes a la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) sobre la actividad ChE en bioensayos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados experimentales utilizando el oxón, *in vitro*, con los obtenidos *in vivo* por Kristoff y col., 2006

CI ₅₀	<i>B. glabrata</i> (μM)	<i>L. variegatus</i> (nM)
Metil azinfos, “ <i>in vivo</i> ”	18,78 (8,41-26,50) ^a	18,91 (15,75-31,51) ^a
Metil azinfos oxón, “ <i>in vitro</i> ”	11,46 (6,51-32,04) ^a	7,49 (6,00-9,00) ^a

^a 95% de intervalo de confianza

Más interesante aún es comparar los porcentajes de inhibición de la actividad ChE *in vitro* producidos por diferentes concentraciones de metil azinfos oxón y los porcentajes de inhibición originados por exposición *in vivo* a diferentes concentraciones de metil azinfos en: *B. glabrata* (Figura 4.25) y *L. variegatus* (Figura 4.26).

De manera sorprendente, se observó el mismo patrón de inhibición y a prácticamente las mismas concentraciones molares de metil azinfos y de metil azinfos oxón, en bioensayos totalmente independientes, llevados a cabo en condiciones experimentales completamente distintas (*in vivo* e *in vitro*). Estos resultados sugieren

4. Discusión

que a las 48 horas de exposición *in vivo* al metil azinfos ambos invertebrados habrían activado metabólicamente una cantidad de metil azinfos oxón directamente proporcional a la concentración de pesticida en el medio de exposición. Küster y col. (2007) estudiaron la inhibición de las actividades ChE y CbE por acción del carbamato aldicarb en embriones del pez *Danio rerio*, en bioensayos *in vitro* e *in vivo*. Al igual que nuestros resultados, los efectos de la inhibición del aldicarb sobre las enzimas analizadas reflejaron los resultados de la inhibición *in vivo*. Un leve incremento de sensibilidad en el estudio *in vitro* representada por un factor de 2 se vio al comparar las concentraciones inhibitorias de la exposición *in vivo* e *in vitro* para la enzima ChE. Por otro lado, no se observó ninguna diferencia en la inhibición de la actividad CbE entre las exposiciones *in vivo* e *in vitro*. Estos autores, en total coincidencia con nuestros resultados postularon que, la exposición de los homogenatos a las formas biológicamente activas de los xenobióticos incrementaría la velocidad de los análisis. Los mismos, podrían ser completados en pocas horas en lugar de varios días, como sucede con los estudios *in vivo*, pudiéndose usar como una herramienta predictiva para la evaluación de los efectos tóxicos. Como en los homogenatos faltan algunas barreras fisiológicas y físicas las cuales podrían interferir con la absorción, la eliminación o finalmente con la inhibición enzimática, las diferencias entre los dos escenarios de exposición deberían ser conocidos y bien definidos para nuevas clases de sustancias con mecanismos de acción similares, como son los agentes anticolinesterásicos.

4. Discusión

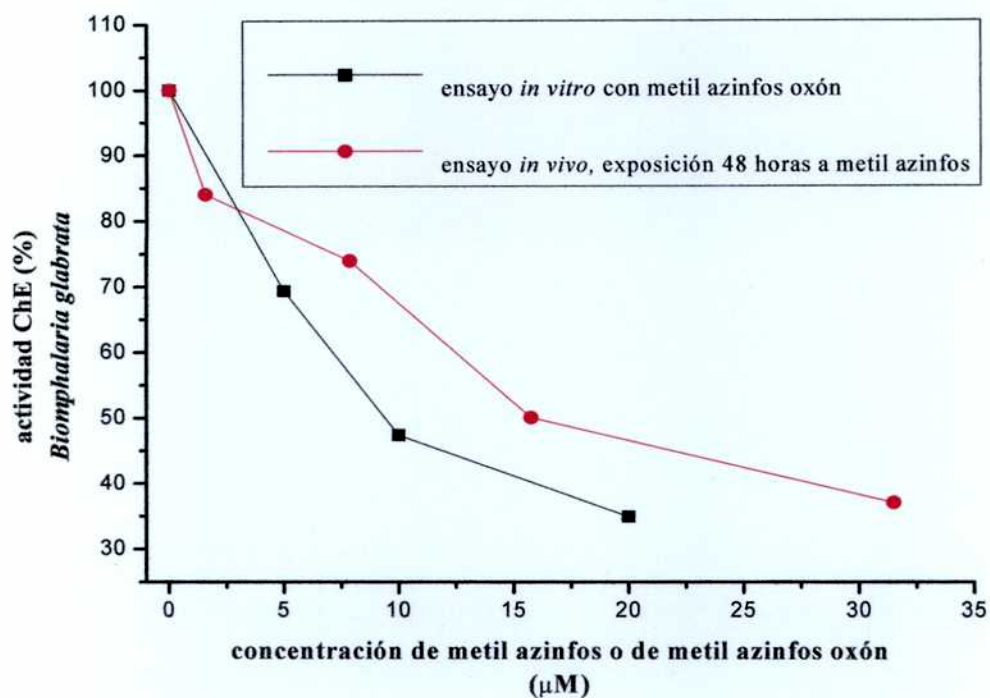


Figura 4.25: Porcentaje de actividad ChE en *B. glabrata* en función de la concentración de metil azinfos o de metil azinfos oxón (μM)

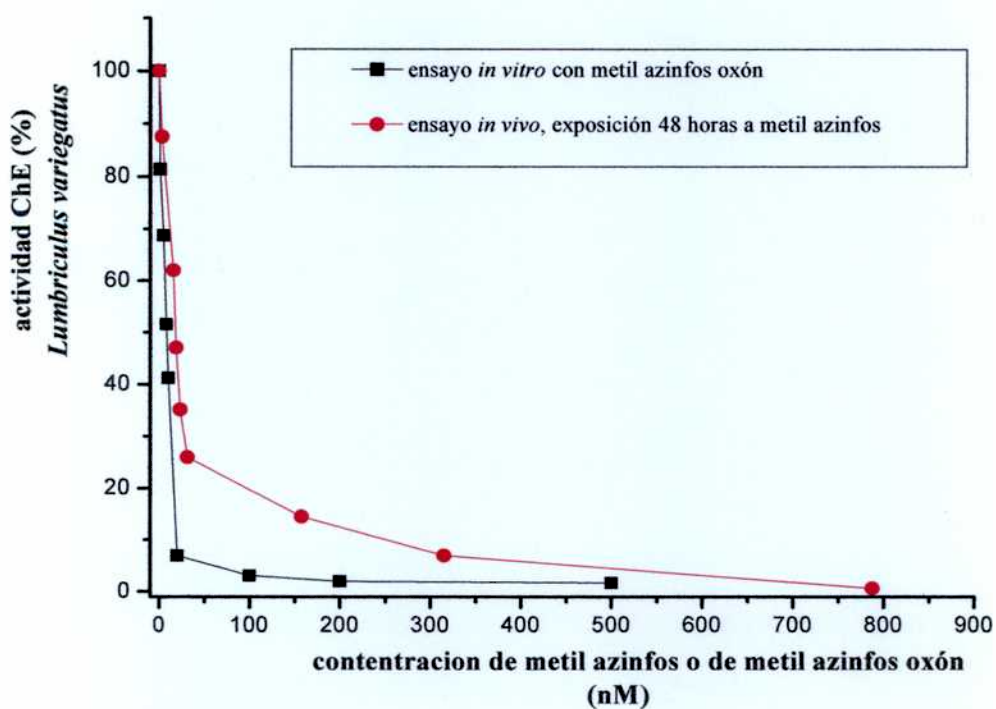


Figura 4.26: Porcentaje de actividad ChE en *L. variegatus* en función de la concentración de metil azinfos o de metil azinfos oxón (nM)

4. Discusión

Como vimos, la actividad ChE de *L. variegatus* y *B. glabrata* fue inhibida por exposición *in vivo* al metil azinfos e *in vitro* al metil azinfos oxón. Sin embargo, ambas especies de invertebrados mostraron una muy diferente susceptibilidad al insecticida. *In vivo*, la CI_{50} fue unas 1000 veces menor en *L. variegatus* que en *B. glabrata*, reflejando que los oligoquetos eran organismos mucho más sensibles. *In vitro*, la CI_{50} resultó de la misma magnitud que *in vivo*, unas 1500 veces menor en el oligoqueto que en el gastrópodo. *In vivo*, la actividad ChE promedio se redujo significativamente en ambos organismos dentro de las 24 horas de exposición, con mayores reducciones en la actividad a las 48 horas. En concordancia con estudios en otras especies (Ferrari y col., 2004b), la exposición de ambos organismos al metil azinfos por 72 y 96 horas, en ensayos estáticos o con renovación del medio, resultaron en una inhibición de la ChE no significativamente diferente de la observada a las 48 horas. Estos resultados se pueden relacionar, al menos en *B. glabrata*, con el mantenimiento de un estado estacionario aparente observado a partir de las 4 horas y hasta las 24 horas de exposición, es decir, que una vez que se ha alcanzado el equilibrio entre la absorción y distribución del xenobiótico y su eliminación y biotransformación se logra finalmente, la mayor intensidad de la inhibición enzimática que no se modifica mientras dure dicho estado estacionario. Es más, el estado estacionario en *B. glabrata* se alcanzó más rápidamente que la máxima inhibición observada que luego se mantiene a lo largo del tiempo de exposición. Esto sugiere que la activación metabólica del fosforotioato se produce lentamente o que poderosas “trampas de oxón”, tal como, las esterasas inespecíficas sugeridas por Kristoff y col. (2006) en *B. glabrata* y *L. variegatus* son los primeros mecanismos de defensa. Las carboxilesterasas (CbEs), unas B-esterasas ubicuas (Barron y col., 1999), participan en la detoxificación de los insecticidas organofosforados y carbamatos por dos mecanismos principales: por la hidrólisis de ésteres carboxílicos presentes en los carbamatos y algunos organofosforados y, por su propia inhibición, lo que reduce la cantidad de insecticida que efectivamente alcanza el sitio activo de la AChE (Jokanovic, 2001). Estas serino enzimas son fosforiladas o carbamoiladas por organofosforados y carbamatos, respectivamente, y así son inhibidas. Ferrari y col. (2001) observaron en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, una significativa inhibición de la actividad CbE hepática después de 24-96 horas de exposición a concentraciones subletales de metil azinfos. Este insecticida causó una inhibición de la actividad CbE dependiente de la concentración y del tiempo, alcanzando un 41% de inhibición a concentraciones de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ dentro de las 24 horas. Nuestros resultados

4. Discusión

sugieren que las CbEs podrían ser las primeras en inhibirse, fundamentalmente a partir de las 4 horas que se alcanza el estado estacionario y luego, superadas en su capacidad de hidrólisis o inhibidas por la cantidad de oxón que se forma, éste último, comienza a inhibir a las ChEs como se vio experimentalmente dentro de las 24 horas.

Kristoff y col. (2006), luego de la exposición de los organismos al metil azinfos a sus respectivas CI_{50} por 48 horas, los transfirieron a un medio sin pesticida por 21 días. En el caso de *L. variegatus* también realizaron la experiencia de recuperación a la concentración de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos que producía el 90% de inhibición enzimática. En estos estudios de depuración, los caracoles mostraron una recuperación parcial de la actividad enzimática a los 7 días, a pesar de esto, ninguna recuperación posterior se observó hasta el día 21. En este último punto, la actividad ChE era todavía de un 72% con respecto a la del control. En contraste, las lombrices expuestas a su CI_{50} por 48 horas mostraron casi una completa recuperación de la actividad colinesterasa el día 21. Por otro lado, la apariencia de estas lombrices recordaba el aspecto asintomático de los controles. Sin embargo, cuando el proceso de recuperación se efectuó frente a una exposición de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 48 horas, ninguna recuperación significativa de la actividad se verificó después de 21 días de depuración. A pesar de esto, las lombrices mostraron mayor movilidad y un aspecto más relajado que el que presentaban antes del proceso de recuperación. Nuestros resultados toxicocinéticos, en ambas especies, mostraron una cinética de eliminación del metil azinfos muy rápida durante la fase de depuración. Sin embargo, la inhibición de la actividad ChE permaneció por semanas luego de haber desaparecido el pesticida de los tejidos. Más aún, en *L. variegatus*, fue evidente incluso a la concentración de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, donde la actividad ChE continuó prácticamente con inhibición total por semanas, una notoria mejoría en la sintomatología descrita a las pocas horas de la fase de depuración coincidente con la eliminación del pesticida de los tejidos. Además de procesos toxicocinéticos, tales como la absorción, metabolismo y excreción, procesos toxicodinámicos, tales como diferencias en la sensibilidad de las enzimas blanco, pueden contribuir a la diferente susceptibilidad para la inhibición de las ChEs entre las especies. Varios trabajos sustentan esta hipótesis. Estudios llevados a cabo en *Gasterosteus aculeatus* revelaron que la BChE fue 1000 veces más sensible al paraoxón que la AChE (Wogram y col., 2001). Estos resultados son coincidentes con nuestros estudios *in vitro* con el metil azinfos oxón dado que la actividad ChE principal de *L. variegatus* es BChE y en *B. glabrata* es AChE, con una mayor sensibilidad del mismo orden de magnitud a favor de

4. Discusión

la primera especie. Por otro lado, la presencia de ChEs relativamente insensibles a organofosforados en algunos invertebrados acuáticos fue publicado por Bocquené y col., (1997) y Mora y col., (1999). Además, se observó una correlación entre el tamaño del sitio esterásico de la enzima y la insensibilidad a compuestos organofosforados. Así, el sitio esterásico de la ChE de una cepa de un artrópodo no resistente era más grande que el correspondiente a la cepa resistente (Sabih y col., 1971).

Es de notar que no se observó mortalidad en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas. Los desórdenes de locomoción fueron observados por Kristoff y col. (2006) en las lombrices expuestas a partir de concentraciones ligeramente superiores a la NOEC ($0,001 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos), los oligoquetos presentaron movimientos incoordinados y ensortijamiento de la cola. A la CI_{50} ($0,006 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos), sólo los segmentos anteriores de los oligoquetos conservaron movilidad. A la concentración de $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (90% de la inhibición de la ChE) las lombrices mostraron una falta total de movimiento, contracciones y ensortijamiento de todo el cuerpo. Como vimos, para hacer comparables los ensayos toxicocinéticos en ambos organismos elegimos una concentración de exposición de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos, correspondiente a la CI_{50} de la actividad ChE en *B. glabrata* a la 48 horas de exposición. Ningún desorden de locomoción se observó en *B. glabrata* frente a exposiciones por 48 horas de metil azinfos ($0,05$ - $15 \mu\text{g ml}^{-1}$). Sin embargo, la exposición del oligoqueto a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ del pesticida representó una concentración 50 veces superior a la que produce el 90% de inhibición de la actividad ChE. A pesar de esta concentración de inhibición prácticamente total de la actividad ChE tampoco se observó mortalidad de las lombrices durante los bioensayos, pero toda la sintomatología antes descripta aparece de manera inmediata a la exposición a lo que debemos sumar una marcada cianosis que desaparece a las pocas horas y una tendencia permanente a permanecer agregadas.

La correlación entre inhibición de la actividad ChE y mortalidad no ha sido completamente establecida. Así, mientras algunas especies toleran altos niveles de inhibición ChE sin mortalidad, otras mueren (Chambers y Carr, 1995; Fulton y Key, 2001). De manera similar a nuestros resultados, Ferrari y col. (2004a) describieron que después de la exposición del pez dorado por 96 horas a $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos, los peces presentaban una inhibición de la ChE del 90% sin letalidad. De hecho, la CL_{50} fue 70 veces mayor. Resultados similares se reportaron para otras especies de peces y crustáceos donde las concentraciones subletales de pesticidas organofosforados indujeron más del 70-90% de inhibición de la ChE (Gruber y Munn, 1998; Varó y col.,

4. Discusión

2002; Varó y col., 2003). Más aún, la correlación entre la inhibición de la actividad ChE y el inicio de los síntomas de intoxicación es compleja y variable. Así, las ChEs resultan ser un muy buen marcador de exposición principalmente para insecticidas organofosforados y carbamatos, pero no necesariamente reflejan toxicidad aguda. La interacción inicial entre el xenobiótico y su blanco celular es esencial pero no suficiente para obtener los signos característicos de toxicidad (Pope, 1999). La modulación de algunos de los procesos neuroquímicos involucrados en la síntesis de acetilcolina, la unión al receptor colinérgico, o la transducción de la señal, concurren con la exposición al pesticida, pudiendo influenciar la progresión de eventos desde la inhibición de la AChE a la expresión de neurotoxicidad.

Algunos xenobióticos ven su toxicidad incrementada por las reacciones mediadas por las monooxigenasas del citocromo P450. Ejemplo de esto son los insecticidas organofosforados que contienen grupos fosforotioato, tal como, el metil azinfos, que requiere la acción de una reacción de desulfuración mediada por una monooxigenasa para formar el oxón derivado de la molécula parental. Así, para estos compuestos, la coadministración de butóxido de piperonilo (PBO) sirve para disminuir efectivamente la toxicidad en los invertebrados acuáticos bloqueando la activación de los pesticidas por el citocromo P450 (Ankley y col., 1991). Ankley y Collyard (1995) efectuaron ensayos de toxicidad aguda con el objeto de determinar la CL_{50} en el oligoqueto *L. variegatus* expuesto a una serie de insecticidas organofosforados en presencia o ausencia de PBO. Estos autores observaron que la coadministración de PBO con diazinon o con diclorvos no modificaba la toxicidad de los organofosforados en *L. variegatus*. Además, postularon que *L. variegatus* era relativamente insensible al diazinon y al metil azinfos, y que el PBO no reducía la toxicidad de estos insecticidas, por lo que concluyeron que el oligoqueto era incapaz de la reacción de desulfuración necesaria para producir el oxón derivado. Pero también afirmaron que el oligoqueto era insensible al diclorvos, el cual no requería activación metabólica. Lamentablemente, estos autores relacionaron directamente la sensibilidad a organofosforados con mortalidad, pero no tuvieron en cuenta la sensibilidad de estos organismos a la inhibición de la actividad ChE frente a estos fosforotioatos en presencia o ausencia de PBO. Más aún, la CL_{50} en *L. variegatus* con metil azinfos, no la pudieron determinar. De manera coincidente a nuestros resultados, altas concentraciones de exposición al metil azinfos no producen mortalidad en el oligoqueto, no obstante, concentraciones muy bajas son suficientes para inhibir sustancialmente la actividad ChE. Pero, esta

4. Discusión

inhibición no es producida por el metil azinfos, sino por el oxón derivado según nuestros ensayos *in vitro*.

Otros trabajos remarcan la importancia del sistema de monooxigenasas de función mixta dependientes del citocromo P450 como responsable de la reacción de desulfuración de los fosforotioatos. Así, por ejemplo, Ferrari A. y col. (2004a,b) estudiaron la susceptibilidad de dos vertebrados acuáticos: *Oncorhynchus mykiss* y *Buffo arenarum* al metil azinfos. La CI_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de la actividad ChE fue de 0,0004 en *O. mykiss* y de 5,61 en las larvas *B. arenarum*. Los embriones de *B. arenarum* tienen baja actividad del citocromo P450 (Anguiano y col., 1994, 2001) y esta actividad se incrementa durante el desarrollo, pero es baja comparada con la de mamíferos o peces. De esta manera, sugirieron que la menor inhibición de la actividad ChE en las larvas de *B. arenarum*, comparadas con la del pez, podían reflejar una menor actividad metabólica en la larva de los anfibios.

Sin embargo, los datos experimentales obtenidos por Kristoff y col. (2006) mostraron inhibición *in vivo* por el metil azinfos y, nuestro trabajo demostró inhibición *in vitro* por el oxón derivado, pero no, por el compuesto parental en *B. glabrata* y *L. variegatus*, sugiriendo que ambas especies pueden formar el oxón derivado de este pesticida, independientemente de que dicha activación metabólica esté relacionada o no con el sistema de monooxigenasas de función mixta dependiente del citocromo P450.

Los xenobióticos se eliminan del organismo sin modificarse o bien como metabolitos. Las rápidas cinéticas de eliminación que hemos encontrado durante la fase de depuración del metil azinfos en *B. glabrata* y *L. variegatus* sugieren que además de la excreción del compuesto parental, los metabolitos producidos en procesos de biotransformación podrían contribuir en ambos invertebrados a dichas cinéticas. Las reacciones de Fase II podrían ser una vía importante de detoxificación del metil azinfos, mediante conjugación con glutatión, entre otras. En este sentido, Kristoff y col. (2008) no observaron cambios significativos en los niveles totales de glutatión (t-GSH) en los ejemplares pigmentados de *B. glabrata* expuestos a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos durante 48 o 96 horas. En cambio, en los caracoles no pigmentados la exposición por 96 horas mostró significativos aumentos en los niveles de t-GSH comparados con los del grupo control. En el caso de *L. variegatus* la exposición a metil azinfos desencadenó incrementos significativos dosis dependiente sobre el t-GSH en todos los grupos expuestos. De manera interesante, los niveles de t-GSH en los controles de *L. variegatus* fueron aproximadamente cuatro veces mayores que los niveles en los controles

4. Discusión

pigmentados y no pigmentados de *B. glabrata*. La capacidad de supervivencia que hemos observado en nuestro trabajo en *L. variegatus* a exposiciones muy superiores a las utilizadas por Kristoff y col. (2006) podrían explicarse, en parte, a la alta disponibilidad de t-GSH observada por Kristoff y col. (2008) que incrementaría ampliamente el umbral de la respuesta tóxica. Además, el t-GSH podría jugar un papel más importante en *L. variegatus* que en *B. glabrata*, no sólo como defensa antioxidante, sino en una mayor actividad en reacciones de conjugación de Fase II. El subsecuente incremento en los niveles de GSH permitiría a los organismos detoxificar al pesticida, remover las especies reactivas de oxígeno generadas por el mismo e incrementar la tolerancia al pesticida. De hecho, estudios llevados a cabo en la anguila europea expuesta a concentraciones letales de diclorvos (Peña-Llopis y col., 2003) y en los bivalvos *Mytilus galloprovincialis* y *Flexopecten flexuosus* expuestos a fenitrothion (Peña-Llopis y col., 2002) mostraron que el deterioro del estatus redox de GSH estaba asociado con disminución de la supervivencia. Kristoff y col. (2008) observaron que la actividad de la Glutathión-S-Transferasa (GST) sólo mostró un incremento de la actividad inducida por el metil azinfos en los oligoquetos que habían sido expuestos a las más altas concentraciones del pesticida durante 96 horas. Contardo-Jara, V. y Wiegand, C. (2008) encontraron incrementos de un 15% en la actividad de GST soluble luego de la exposición por un día a $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ del herbicida atrazina en *L. variegatus*. Una elevación importante también fue detectada luego de tres días de exposición a $0,5$ y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de atrazina. Estos investigadores observaron que la actividad de GST soluble se mantuvo significativamente elevada después de 4 o hasta 7 días de exposición y postularon que la actividad enzimática de *L. variegatus* se incrementaría luego de un periodo de acumulación. Estos resultados son muy interesantes si tenemos en cuenta que el grupo saliente del insecticida organofosforado metil azinfos es un núcleo triazínico, tal como lo es el herbicida atrazina. Este núcleo se libera en cantidades equimolares al metil azinfos oxón, cada vez que éste fosforila a una esterasa inespecífica o a las ChEs. La falta del incremento en la actividad GST observada a bajas concentraciones de exposición al metil azinfos en *L. variegatus* por Kristoff y col. (2008) se podría deber a que el grupo saliente en la reacción de fosforilación se encontraría a una concentración de uno o más órdenes de magnitud más baja que las usadas por Contardo-Jara y Wiegand (2008). Trabajos más recientes demuestran que el incremento de la actividad GST soluble en *L. variegatus* es dependiente de la concentración y tiempo de exposición al xenobiótico. En este sentido, Contardo-Jara y

4. Discusión

col. (2009) estudiaron la bioacumulación del herbicida glifosato y del producto comercial Roundup Ultra en *L. variegatus* y sus efectos sobre la biotransformación y las enzimas antioxidantes. Estos autores determinaron que el FBC variaba entre 1,4 y 5,9 dependiendo de las diferentes concentraciones de exposición usadas; en este caso, los FBC resultaron mayores al estimado a partir del $\log K_{ow}$, debido a que el glifosato es hidrofílico. De manera interesante observaron que la actividad GST soluble se incrementó significativamente después de la exposición al glifosato y al formulado comercial en casi todas las concentraciones ensayadas. Este incremento en la actividad GST soluble fue más marcado al utilizar la formulación comercial, dado que en ésta, los agentes tensioactivos facilitarían el transporte del herbicida a través de las membranas biológicas.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos a través del presente trabajo permiten enunciar las siguientes conclusiones:

1. El método desarrollado y validado por HPLC con detector UV-Visible resultó útil para detectar y cuantificar al pesticida organofosforado metil azinfos en soluciones acuosas a partir de concentraciones de $0,055 \mu\text{g ml}^{-1}$. Además, el método es específico para la cuantificación del pesticida en las matrices biológicas de *L. variegatus* y *B. glabrata*.

2. Los estudios de estabilidad del pesticida en agua, en las condiciones de los bioensayos, demostraron la constancia de la concentración durante, al menos, las 24 horas de exposición de los organismos. En estas condiciones, el pesticida no presentó una degradación apreciable.

3. La absorción en ambos invertebrados fue similar y rápida frente a exposiciones a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de metil azinfos, alcanzando en pocas horas un estado estacionario aparente.

4. La capacidad de bioconcentración de metil azinfos fue similar en ambos invertebrados.

5. En ambas especies, durante la fase de depuración, la eliminación del pesticida resultó ser muy rápida y pudo ser asumida como un modelo unicompartimental de primer orden. El porcentaje de eliminación del pesticida fue en las dos primeras horas de depuración del 71% en el gastrópodo y del 89% en el oligoqueto.

6. Los estudios *in vitro* mostraron una inhibición enzimática dependiente de la concentración del metil azinfos oxón. En cambio, el metil azinfos *per se* no inhibió la actividad ChE.

7. El patrón de inhibición concentración dependiente de la actividad ChE *in vitro* por el metil azinfos oxón es característico de cada especie de invertebrado y mostró una correlación muy similar a la inhibición de la actividad ChE por el metil azinfos observada en los estudios *in vivo*.

5. Conclusiones

8. En cada uno de los invertebrados, las CI_{50} en los ensayos *in vivo* con el metil azinfos fueron del mismo orden de magnitud y muy semejantes a las CI_{50} producidas *in vitro* por el metil azinfos oxón.

9. Independientemente de las rutas metabólicas utilizadas, ambos invertebrados tienen la capacidad de activar metabólicamente al metil azinfos a su correspondiente oxo-derivado.

10. La mayor sensibilidad a la exposición *in vivo* al metil azinfos en *L. variegatus* se debería, al menos en parte, a la mayor sensibilidad de las ChEs del oligoqueto al metil azinfos oxón.

11. En ambos invertebrados, la persistencia en la inhibición de la actividad ChE en el tiempo, durante la fase de depuración, sería el resultado de una inhibición irreversible y del envejecimiento de las ChEs.

12. La diferente sensibilidad de ambas especies a la inhibición de la actividad ChE por metil azinfos se debería más a factores toxicodinámicos que a factores toxicocinéticos.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

Abd Allah, A.T., Wanas, M.Q.A., Thompson, S.N., 2003. Dissolved heavy metals, lead, cadmium and mercury, accumulate in the body of the schistosome vector, *Biomphalaria glabrata* (gastropoda: pulmonata). J. Moll. Stud. 69, 35–41.

Abdullah, A.R., Kumar, A., Chapman, J.C., 1994. Inhibition of acetylcholinesterase in the Australian freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) by profenofos. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1861-1866.

Anderson, B.G., 1980. En: Aquatic Invertebrate Bioassays, ASTM STP 715, Buikema A.L., Cairns, J. (editores), American Society for Testing and Materials, 3-35.

Anguiano, O.L., Montagna, C.M., Llamas, M.C., Gauna, L., Pechén de D' Angelo, A.M., 1994. Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 52, 649-655.

Ankley G.T., Dierkes, J.R., Jensen, D.A., Peterson, G.S., 1991. Piperonyl butoxide as a tool in aquatic toxicological research with organophosphate insecticides. Ecotoxicol. Environ. Saf. 21, 266-274.

Ankley, G.T., Collyard, S.A., 1995. Influence of piperonyl butoxide on the toxicity of organophosphate insecticides to three species of freshwater benthic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 110, 149-155.

ASTM, American Society for Testing and Materials, 1995. Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates. E 1393–94a. En: Annual Book of ASTM Standards, vol. 11.05. Philadelphia, PA.

Atterberry, T.T., Chambers, H.W., Chambers, J.E., 1997a. Developmental changes in A-esterase activity toward the oxons of two phosphorothionate insecticides in male rats. Toxicologist 30, 283.

Atterberry, T.T., Burnett, W.T., Chambers, J.E., 1997b. Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: Target and nontarget esterase

6. Bibliografia

sensitivity and cytochrome P450-mediated metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 411-418.

Barberá, C., 1989. *Pesticidas agrícolas*, Ediciones Omega, Barcelona, 125-131.

Barron M.G., Charron K.A., Stott W., Duvall S., 1999. Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2506-2511.

Basack, S.B., Oneto, M.L., Fuchs, J.S., Wood, E.J., Kesten, E.M., 1998. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 569-576.

Belzunces, L.P., Toutant, J-P., Bounias, M., 1988. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterised by Triton X-114 phase separation. *Biochem. J.* 255, 463-470.

Bendahou, N., Bounias, M., Fleche, C., 1999. Toxicity of cypermethrin and fenitrothion on the hemolymph carbohydrates, head acetylcholinesterase, and thoracic muscle Na^+, K^+ -ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera*. L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44, 139-146.

Bitton, G., Dutka, B.J., 1986. (editores). En: *Toxicity testing using microorganisms*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. Volumen I, 80-151.

Bitton, G., Koopman, B., 1992. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 125, 1-22.

Bloomfield J.P., Williams R.J., Gooddy D.C., Cape J.N., Guha P., 2006. Impacts of climate change on the fate and behaviour of pesticides in surface and groundwater: a UK perspective. *Sc. Tot. Environ.* 369, 163-177.

Bocquene, G., Roig, A., Fournier, D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Lett.* 407, 261-266.

6. Bibliografía

Calow, P., 1989. The choice and implementation of environmental bioassays. *Hydrobiologia* 188/189, 61-64.

Carvalho, G.A., Ueta, M.T., Andrade, C.F.S., 2001. Búsqueda de xifidiocercarias (Trematoda) en moluscos de agua dulce recolectados en nueve municipios del Estado de São Paulo, Brasil. *Bol. Chil. Parasitol.* 56, 3-9.

Casida, J.E., 1955. Comparative enzymology of certain insect acetylsterases in relation to poisoning by organophosphorus insecticides. *Biochem. J.* 60, 487-496.

Chambers, H.W., Brown, B., Chambers, J.E., 1990. Noncatalytic detoxication of six organophosphorus compounds by rat liver homogenates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 36, 308-315.

Chambers, J.E., Carr, R.L., 1995. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticide toxicity. *Toxicology* 105, 291-304.

Chambers, J.E., Chambers, H.W., 1989. Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *J. Biochem. Toxicol.* 4, 201-203.

Clark, T., Clark, K., Paterson, S., Norstrom, R., Mackay, D., 1988. Wildlife monitoring, modelling and fugacity. *Environ. Science Technol.* 22, 120-127.

Clements, W.H., 2000. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview. *J. Aquat. Ecol. Stress Rec.* 7, 113-116.

Contardo-Jara, V., Wiegand, C., 2008. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegatus* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere* 70, 1879-1888.

Contardo-Jara, V., Klingelmann E., Wiegand, C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation on Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ. Pollut.* 157, 57-63.

6. Bibliografía

Connell, D.W., 1987. Ecotoxicology a framework for investigations of hazardous chemicals in the environment. *Ambio* 16, 47-50.

Cooney, J.D., 1995. Freshwater tests. En: Rand, M.G. (Ed), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington DC, 71-102.

De Bruijn, J., Hermens, J., 1991. Uptake and elimination kinetics of organophosphorus pesticides in the guppy (*Poecilia reticulata*): Correlations with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 791-804.

de la Torre, F. R., 2001. Estudio integrado de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de estrés ambiental. Tesis para optar al grado de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 2-12.

Dixon, P.M., Newman, M.C., 1991. En: *Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications*; Newman, M.C., McIntosh, A.W., editores. Lewis Publishers, Inc., 207-242.

Dorigan, J.V., Harrison, F.L., Costlow, J.D., Crecelius, E.A., Jenkins, K.D., Roughgarden, J.D., Templeton, W.L., 1987. En: *Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses*. Department of Energy, United States of America. DOE/ER-0317, 7-26.

Drewes, C.D., Brinkhurst R.O., 1990. Giant fibers and rapid escape reflexes in newly hatched aquatic oligochaetes, *Lumbriculus variegatus* (Family Lumbriculida). *Invert. Reprod. Develop.* 17, 91-95.

Drewes, C.D., 1997. Sublethal effects of environmental toxicants on oligochaete escape reflexes. *American Zool.* 37, 346-353.

Dutka, B.J., 1988. (editor) *Methods for microbiological and Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*. National Water Research Institute (NWRI). Canada Centre for Inland Waters (CCIW), Burlington, Ontario, Canadá.

6. Bibliografía

Dutka, B.J., 1991. Stability and Replicability of Bioassays Used in the Battery of Tests Approach for Aquatic Ecosystem Screening. National Water Research Institute (NWRI). Canada Centre for Inland Waters (CCIW), Burlington, Ontario, Canadá. Contribution 91-72.

Edwards, C.A., Fisher, S.W., 1991. The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. En: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment. Elsevier, Amsterdam, 255-275.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

Engel, D.W., Vaughan, D.S., 1996. Biomarkers, natural variability and risk assessment: Can they co-exist? Hum. Ecol. Risk Assess. 2, 257-262.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1977. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 4, Bases for Selecting Biological Tests to Evaluate Marine Pollution. Rome, FAO Fish. Tech. Pap. 164, 1-31.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1987. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 10, Short term Static Bioassays. Rome, FAO Fish. Tech. Pap. 247, 1-62.

Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D' Angelo, A.M., 2004a. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 57, 420-425.

Ferrari A., Anguiano O.L., Soleño J., Venturino A., Pechen de D'Angelo, A.M., 2004b. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. Comp. Biochem. Physiol., 139C, 239-243.

6. Bibliografia

Ferrari A., Venturino A., Pechén de D'Angelo A.M., 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pest. Biochem. Physiol.* 88, 134-142.

Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Fleisher, J.H., Harris, L.W., 1965. Dealkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methylphosphonofluoridate. *Biochem. Pharmacol.* 14, 641-650.

Forsyth, C.S., Chambers, J.E., 1989. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1597-1603.

Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37-45.

Fried, B., Sundar Rao, K., Sherma, J., 1992. Fatty acid composition of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) fed hen's egg yolk versus leaf lettuce. *Comp. Biochem. Physiol.* 101 A, 351-352.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP), 1993. Joint group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution: Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Reports and Studies N 50. London: International Maritime Organization.

Giesy, J.P., Solomon, K.R., Coats, J.R., Dixon, K.R., Giddings, J.M., Kenaga, E.E., 1999. Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American aquatic environments. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 160, 1-129.

Gobas, F.A.P.C., 1993. A model for predicting the bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in aquatic food-webs: application to Lake Ontario. *Ecologic. Modell.* 69, 1-17.

6. Bibliografía

Gobas, F.A.P.C., Morrison, H.A., 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. En: Boethling, R.S., Mackay, D. (Eds.), Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals. CRC Press, Boca Raton, FL, 189-231.

Greig-Smith, P.W., 1991. Use of cholinesterase measurements in surveillance of wildlife poisoning in farmland. En: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 127-150.

Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 1997. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Argentina, 133-135.

Gunning, R.V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1998. Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera*. Pestic. Biochem. Physiol. 62, 147-151.

Gruber, S.I., Munn, M.D., 1998. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 391-396.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). Department of Health and Human Services, 1999.

Hyne R., Mahen W., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline, Ecotoxicol. Environ. Saf. 54, 366-374.

Jensen, C.S., Garsdal, L., Baatrup, E., 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behaviour in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1727-1732.

Jokanoic M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology 166, 139-160.

6. Bibliografia

Kralj M., Franko, M., Trebse, P., 2006. Photodegradation of organophosphorus insecticides. Investigations of products and their toxicity using gas chromatography–mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere* 67, 99-107.

Klosterhaus, S., DiPinto, L., Chandler, T., 2003. A comparative assessment of azinphosmethyl bioaccumulation and toxicity in two estuarine meiobenthic harpacticoid copepods. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2960-2968.

Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N., Pechén de D'Angelo A.M., Cochón A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology* 222, 185-194.

Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., Cochón A.C., 2008. Effects of azinphos-methyl on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere* 72, 1333-1339.

Küster, E., Altenburger, R., 2007. Suborganismic and organismic effects of aldicarb and its metabolite aldicarb-sulfoxide to the zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Chemosphere* 68, 751-760.

Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., 1991. Factors determining the uptake of persistent pollutants in an eel population (*Anguilla anguilla* L.). *Environ. Pollut.* 69, 39-59.

Legierse K.C.H.M., Sijm T.H.M., van Leeuwen C.J., Seinen W., Hermens J.L.M., 1998. Bioconcentration kinetics of chlorobenzenes and the organophosphorus pesticide chlorthion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: a comparison with the guppy *Poecilia reticulata*. *Aquat. Toxicol.* 41, 301-323.

Lesiuk N., Drewes C.D., 1999. Autotomy reflex in a freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Hydrobiologia* 406, 253-261.

6. Bibliografia

- Lesiuk, N., Drewes, C.D., 2001. Behavioral plasticity and central regeneration of locomotor reflexes in the freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. I. Transection studies. *Invert. Biol.* 120, 248-258.
- Liang T., Lichtenstein, E, 1972. Effect of light, temperature, and pH on the degradation of azinphosmethyl. *J. Econ. Entomol.* 65, 315-321.
- Lin, S-N., Chen, Ch-Y., Murphy, S., Caprioli, R., 1980. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for the analysis of the *in vitro* metabolism of the insecticide azinphos-methyl (Guthion) by rat liver homogenates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 85-88.
- Livingstone D.R., 1992. Persistent pollutants in marine invertebrates. En: *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. Oxford: Pergamon, 3-34.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 195-211.
- Loewy M., Kirs V., Carvajal G., Venturino A., Pechen de D'Angelo, A., 1999. Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci. Total Environ.* 225, 211-218.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A., Farr, L., Randall, R.S., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 249, 265-275.
- Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ. Pollut.* 110, 375-391.
- Maltby, L., Calow, P., 1989. *Hydrobiologia* 188/189, 65-76.
- Martin, A.D., Norman, G., Stanley, P.I., Westlake G.E., 1981. Use of reactivation techniques for the differential diagnosis of organophosphorus and carbamate pesticide poisoning in birds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 775-780.

6. Bibliografía

Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., 1999. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem.-Biol. Interact.* 119-120, 29-42.

Maxwell, D.M., 1992. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 306-312.

McCarty, L.S., Munkittrick, K.R., 1996. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2, 268-274.

Ménager M., Pan X., Wong-Wah-Chung P., Sarakha M., 2007. Photochemistry of the pesticide azinphos methyl and its model molecule 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one in aqueous solutions: Kinetic and analytical studies. *Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, UMR CNRS 6505, Université Blaise Pascal, F-63177 Aubiere-Cedex, France.*

Miller N. y Miller C., 2002. Estadística y quimiometría para química analítica, cuarta edición, Prentice Hall, Madrid, 119-128.

Monteiro W., Dias B.F.S., 1989. Estratégias reprodutivas em *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae). *Ci Cult* 41, 1051-1054.

Mora, P., Fournier, D., Narbone, J.F., 1999. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comp. Biochem. Physiol.* 122C, 353-361.

Moreno Grau, M. D., 2003. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. Editorial McGraw-Hill, Madrid, España, 74-77.

Münzinger, A., 1987. *Biomphalaria glabrata* (say), a suitable organism for a biotest. *Environ. Technol. Lett.* 8, 141-148.

6. Bibliografia

- Neely, B.W., Branson, D.R., Blau, G.E., 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ. Sci. Technol.* 8, 1113-1115.
- Nikkilä, A., Halme, A., Kukkonen, J.V.K., 2003. Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. *Chemosphere* 51, 35-46.
- NRC, 1987. Committee on Biological Markers of the National Research Council (NRC), Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9.
- Peña-Llopis S., Ferrando M.D., Peña J.B., 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate poisoned marine bivalves. *Chemosphere* 47, 485-497.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.* 65, 337-360.
- Pope, C.N., 1999. Organophosphorus pesticides: do they have all the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health., Part B* 2, 161-181.
- Pratap, H.B., Wendelaar Bonga, S.E., 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na^+/K^+ -ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquat. Toxicol.* 26, 133-150.
- Ramírez Mora, B., Martínez-Tabche, L., Sánchez-Hidalgo, E., Castañeda Hernández, G., Gutiérrez Ruiz, M.C., Flores Murrieta, F., 2000. Relationship between toxicokinetics of carbaryl and effect on acetylcholinesterase activity in *Pomacea patula* snail. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 234-239.

6. Bibliografia

Rand, M.G., Wells, P.G., McCarty, 1995. Introduction to aquatic toxicology. En: Rand, M.G. (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, Washington DC., 3-67.

Rickwood C., Galloway T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat. Toxicol.* 67, 45-56.

Ruppert, E. E., Barnes, D. R., 1994. *Invertebrate Zoology*, 6. ed. Fort Worth: Saunders College Publ., 345 pp.

Sancho, E., Ferrando, M.D., Gamón M., Andreu-Moliner, E., 1994a. Uptake and clearance of diazinon in different tissues of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Biomed. Environ. Sci.* 44, 416-422.

Sancho, E., Ferrando, M.D., Gamón M., Andreu-Moliner, E., 1994b. Fenitrothion uptake and bioconcentration in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Toxicol. Environ. Chem.* 44, 81-87.

Sancho, E., 1996. Respuesta fisiológica inducida en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) por la presencia de fenitrothion en el medio. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia, Valencia.

Sancho, E., Ferrando M., Lleó C., Andreu-Moliner, E. 1998. Pesticide toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 245-250.

Schmieder P., Lothenbach, D., Tietge, J., 1995. (3H)-2,3,7,8-TCDD uptake and elimination kinetics of medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1735-1743.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1997. *Biometry. The Principles and Practice of Statistic in Biological Research*. WH Freeman and Company, NY, USA.

6. Bibliografía

Spacie, A., Hamelink, J.L.M., 1982. Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.

Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. En: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, 87-206.

Streit, B., 1992. Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia* 48, 955-970.

Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, República Argentina, 2003. Desarrollo de niveles guía de calidad de agua ambiente correspondientes a metil azinfos.

Sussman, J. L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253, 872-879.

Taylor, P., 2003. Anticolinesterasas. En Goodman Gilman, A. (Ed.): *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, décima edición, volumen I, McGraw- Hill, 184-196.

Taylor P., Radic Z., Hoseaa N., Camp S., Marchota P., Bermanb H., 1995. Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol. Lett.* 82-83, 453-458.

Tsuda, T., Aoki, S., Kojima, M., Harada, H., 1989. Bioconcentration and excretion of diazinon, IBP, malathion and fenitrothion by willow shiner. *Toxicol. Environ. Chem.* 24, 185-190.

Tsuda, T., Aoki, S., Kojima, M., Harada, H., 1990. Bioconcentration and excretion of diazinon, malathion and fenitrothion by carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 96, 23-26.

6. Bibliografía

Tsuda, T., Aoki, S., Inoue, T., and Kojima, M., 1995. Accumulation and excretion of diazinon, fenthion and fenitrothion by killifish: Comparison of individual and mixed pesticides. *Water Res.* 29, 455-458.

U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Interim reregistration eligibility and risk management decision for azinphos-methyl. Office of Pesticide Programs, Washington, DC.

Van der Oost, R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13, 57-149.

Varó, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potencial of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia partenogenética*. *Chemosphere* 48, 563-569.

Varó, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pest. Biochem. Physiol.* 75, 61-72.

Vellom, D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S., Taylor, P., 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32, 12-17.

Verrengia Guerrero, N.R., 1995. Contaminantes metálicos en el Río de La Plata: Monitoreo del sistema acuático y estudio de algunos efectos tóxicos en moluscos bivalvos por medio de bioensayos. Tesis para optar al grado de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Verrengia Guerrero, N.R., Mozzarelli, M.N., Giancarlo, H., Nahabedian, E., Wider, E., 1997. *Biomphalaria glabrata*: relevance of albino organisms as a useful tool for environmental lead monitoring. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 823-827.

6. Bibliografia

Verrengia Guerrero, N.R., Nahabedian, D.E., Wider, E.A., 2000. Analysis of some factors that may modify the bioavailability of cadmium and lead by *Biomphalaria glabrata*. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2762-2768.

Verrengia Guerrero, N.R., Taylor, M.G., Davies, N.A., Lawrence M.A.M., Edwards, P.A., Simkiss, K., Wider, E.A., 2002. Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. Environ. Pollut. 117, 523-530.

Waldichuk, M., 1989. En: Aquatic Toxicology and Water Quality Management. Nriagu, J.O., Lakshminarayana, J.S.S., editores. John Wiley & Sons, Inc., 7-22.

Walker, C.H., 1990. Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. Functional Ecology. 4, 295-301.

Walker C., Fossi M.C., Depledge M.H., Sparagano O., Savva D., Mattei N., Bamber S., Lari L., Sheehan D., Chipman J.K., 1995. Biomarker responses to aromatic hydrocarbons, metals and PCBs in crabs (*Carcinus maenas* and *Carcinus aestuarii*). En: Proceedings of the Symposium European Commission Research Programme on Vulnerable Ecosystems, SETAC Congress, Copenhagen, Denmark, 25-28.

Walker Colin H., 1998. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. Environ. Health Perspect. 106 (Suppl. 2), 613-620.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

Wiegand, C.; Pehkonen, S., Akkanen, J., Penttinen, O.; Kukkonen, J., 2007. Bioaccumulation of paraquat by *Lumbriculus variegatus* of dissolved natural organic matter and impact on energy costs, biotransformation and antioxidative enzymes. Chemosphere 66, 558-566.

6. Bibliografia

Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., Liess, M., 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1528-1531.

Xuereb, B., Noury, P., Felten V., Garric, J., Geffard, O., 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. Toxicology 236, 178-189.

Zinkl, J.G., Lockhart, W.L., Kenny, S.A., Ward, F.J., 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. En: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment. Elsevier, Amsterdam, 233-254.