



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**“Monitoreo ambiental, cuantificación de plaguicidas y
evaluación de efectos neurotóxicos y de estrés oxidativo en
peces dulceacuícolas”**

Tesis presentada para optar el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Daissy Lisbeth Bernal Rey

Directora de Tesis: Dra. Renata Menéndez Helman

Codirectora: Dra. María dos Santos Afonso

Consejera de estudios: Dra. Adriana Cristina Cochón

Lugar de trabajo: Laboratorio de Química de los Contaminantes en Aguas Naturales y Suelos. INQUIMAE- CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, junio 2022

Monitoreo ambiental, cuantificación de plaguicidas y evaluación de efectos neurotóxicos y de estrés oxidativo en peces dulceacuícolas

Resumen

Durante las últimas décadas se consolidó en Argentina un modelo intensificado de producción agropecuaria ligado al uso creciente de plaguicidas. Distintos procesos determinan que estos contaminantes alcancen los cuerpos de agua pudiendo ocasionar efectos adversos sobre la biota. El objetivo general de esta Tesis fue estudiar la calidad del agua, con énfasis en la identificación y cuantificación de diferentes plaguicidas, en un cuerpo de agua superficial de la Provincia de Buenos Aires y evaluar potenciales efectos sobre peces dulceacuícolas. Con este propósito, se realizó durante dos años un monitoreo ambiental de diferentes sitios de un arroyo de la subcuenca Las Catonas, (cuenca del Río Reconquista, Cuartel V, Partido de Moreno, Provincia de Buenos Aires) que presentan impacto antropogénico residencial, agrícola e industrial. Se seleccionaron tres sitios de muestreo, un sitio aguas arriba cercano a una zona residencial (Sitio A, S_A), uno frente a una planta de tratamiento (Sitio B, S_B) y otro aguas abajo del anterior y lindero a una zona hortícola (Sitio C, S_C). A través de la caracterización hidroquímica, pudo concluirse que el tipo de agua dominante en los sitios de muestreo corresponde a bicarbonatada sódica y que predomina el mecanismo de meteorización, características que concuerdan con lo descripto para las lagunas pampásicas. Por otro lado, se determinó que las concentraciones de casi todos los iones mayoritarios son mayores en el S_B y S_C con respecto al S_A , al igual que la concentración de los nutrientes. Estas diferencias espaciales podrían deberse al aporte de compuestos de origen antropogénico de la actividad agrícola e industrial de la zona. Además, se observó una agrupación entre las estaciones cálidas (verano y primavera) separadas de las frías (invierno y otoño). Los plaguicidas detectados en el cuerpo de agua, en muestras correspondientes a S_B y S_C , fueron: DEET, paraquat, clorpirifós y glifosato, en un rango de concentraciones $0,52 - 5,49 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, mientras que en S_A no se identificó ninguno de estos plaguicidas durante los dos años de muestreo.

Por otra parte, se analizaron los efectos de los plaguicidas glifosato (PMG) y clorpirifós (CPF) sobre biomarcadores de neurotoxicidad, defensas antioxidantes, estrés oxidativo y detoxificación en una especie de teleósteo nativo, *Cnesterodon decemmaculatus*, mediante bioensayos semi-estáticos de toxicidad aguda (96 h). La actividad de acetilcolinesterasa (AChE) demostró ser un biomarcador de neurotoxicidad sensible para la exposición a PMG y CPF en esta especie, existiendo una potencial reversibilidad

de los efectos. Adicionalmente, se estudió en forma comparativa el efecto sobre la actividad de AChE de otra especie de poecílido (*Gambusia affinis*) y se analizaron los mecanismos involucrados. La inhibición de la actividad de AChE luego de la exposición *in vivo* a CPF difirió entre ambas especies, siendo *C. decemmaculatus* la especie más susceptible. Estas diferencias podrían deberse a una diferencia en la sensibilidad de la enzima, considerando las IC_{50} determinadas mediante la exposición *in vitro* al metabolito clorpirifós oxón (CPF-oxón). A su vez, la exposición generó una respuesta de las vías de protección antioxidante, glutatión (GSH) para PMG y catalasa (CAT) para CPF, resultando además los efectos variables entre tejidos. Esto podría estar indicando que, si bien ambos plaguicidas estarían induciendo estrés oxidativo, las vías involucradas podrían diferir entre ellos. En el mismo sentido, los resultados sugieren que la enzima glutatión-S-transferasa (GST) estaría involucrada en la vía de detoxificación en el caso del PMG.

Por último, se llevaron adelante bioensayos exponiendo ejemplares de *C. decemmaculatus* a muestras ambientales de los sitios estudiados S_A y S_C , evidenciándose cambios en biomarcadores de neurotoxicidad y de defensas antioxidantes. Los efectos sobre algunos de los parámetros no parecerían estar causados por la exposición a los plaguicidas estudiados y podrían tener baja especificidad ya que se vieron alterados en la exposición tanto a S_A como S_C (enzima superóxido dismutasa, SOD), mientras que para otros biomarcadores (AChE, CAT, GSH) los resultados sugieren que los plaguicidas presentes en las muestras podrían explicar total o parcialmente los cambios observados.

Esta Tesis constituye una contribución al estudio del destino ambiental de los plaguicidas y la toxicidad en especies no blanco. Particularmente se demuestra que tanto PMG como CPF generan efectos sobre biomarcadores de neurotoxicidad y en las defensas antioxidantes de *C. decemmaculatus*. A la vez, al realizar una evaluación de toxicidad en el contexto de muestras ambientales con mezclas complejas de contaminantes, dichos parámetros resultaron ser sensibles a la exposición al agua de la subcuenca Las Catonas evidenciando el deterioro en la calidad del agua que presentan estos arroyos.

Palabras Clave: Monitoreo ambiental, composición fisicoquímica, caracterización hidroquímica, plaguicidas, glifosato, clorpirifós, peces dulceacuícolas, *Cnesterodon decemmaculatus*, biomarcadores, acetilcolinesterasa (AChE), defensas antioxidantes, estrés oxidativo

Environmental monitoring, pesticide quantification and assessment of neurotoxic effects and oxidative stress in freshwater fish

Summary

Over the last decades, an agricultural model of intensive production linked to the increasing use of pesticides was consolidated in Argentina. Different processes determine that these pollutants reach water bodies, which can cause adverse effects on biota. The general objective of this Thesis was to study water quality, with emphasis on the identification and quantification of different pesticides in a surface water body of the Buenos Aires Province and to evaluate their potential effects on freshwater fish.

Considering this, an environmental monitoring was carried out over a period of 2 years on different sites of a stream in Las Catonas sub-basin (Reconquista River basin, Cuartel V, Partido Moreno, Province of Buenos Aires) that have urban, agricultural, and industrial anthropogenic impact. The sampling sites were upstream, close to an urban area, (Site A, S_A); in front of a treatment plant (Site B, S_B); and downstream of S_B and bordering a horticultural area (Site C, S_C). Throughout the hydrochemical characterization, it was possible to conclude that the dominant type of water in the sampling sites corresponds to sodium bicarbonate and that the weathering mechanism is predominating, characteristics that are like to those of pampasic lagoons. On the other hand, it was determined that the concentrations of almost all the major ions are higher in S_B and S_C compared to S_A , as well as the concentration of nutrients.

These spatial differences could be due to the contribution of agricultural and industrial activity in the area. In addition, a grouped data was observed between the warm seasons (summer and spring) separated from the cold seasons (winter and autumn). The pesticides detected in the water body, in samples corresponding to S_B and S_C , were DEET, paraquat, chlorpyrifos and glyphosate in a concentration range of 0.52 - 5.49 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, while none of these pesticides were identified in S_A during the two years of sampling.

Furthermore, the effects of the pesticides glyphosate (PMG) and chlorpyrifos (CPF) on biomarkers of neurotoxicity, antioxidant defenses, oxidative stress, and detoxification in a native teleost species, *Cnesterodon decemmaculatus*, were analyzed by semi-static bioassays of acute toxicity (96 h). Acetylcholinesterase (AChE) activity has been shown to be a sensitive neurotoxicity biomarker for exposure to PMG and CPF in this species, with potential reversibility of the effects. In addition, the effects on the AChE activity for other species of Poeciliidae (*G. affinis*) was comparatively studied and the mechanisms

involved were analyzed. *In vivo* AChE inhibition differed between both species, with *C. decemmaculatus* being the most susceptible species. These differences could be caused by a difference in enzyme sensitivity taking into account the IC₅₀ determined by *in vitro* assays using CPF oxon metabolite. At the same time, the exposure generates a response of the antioxidant protection pathways, glutathione (GSH) for PMG and catalase (CAT) for CPF, also resulting in variable effects between tissues. This could indicate that, although both pesticides are inducing oxidative stress, the pathways involved could differ between them. In the same way, the results suggested that the GST enzyme would be involved in the detoxification pathway in the case of PMG.

Finally, bioassays were carried out exposing specimens of *C. decemmaculatus* to environmental samples from the studied sites (S_A and S_C), showing changes in biomarkers of neurotoxicity and antioxidant defenses. The effects on some of the parameters would not seem to be caused by exposure to the pesticides studied and could have low specificity since they were altered in exposure to both S_A and S_C (superoxide dismutase enzyme, SOD), while for other biomarkers (AChE, CAT, GSH) the results suggested that the pesticides present in the samples could fully or partially explain the observed changes.

This Thesis constitutes a contribution to the study of the environmental fate of pesticides and their toxicity in non-target species. In particular, it has shown that both PMG and CPF generate effects on biomarkers of neurotoxicity and on the antioxidant defenses of *C. decemmaculatus*. At the same time, these parameters turned out to be sensitive to exposure to the water of Las Catonas sub-basin, when carrying out a toxicity assessment in the context of complex mixtures of pollutants, indicating the deterioration of water quality.

Keywords: Environmental monitoring, physicochemical composition, hydrochemical characterization, pesticides, glyphosate, chlorpyrifos, *Cnesterodon decemmaculatus*, biomarkers, acetylcholinesterase (AChE), antioxidant defenses, oxidative stress

Agradecimientos

A mis directoras Mari y Rena, por sus conocimientos, amistad, apoyo en tiempos difíciles, ayuda incondicional durante las campañas de muestreo y de pesca, consejos, orientaciones y generosidad. “Gracias a ellas tuve la oportunidad de disfrutar de una beca doctoral, un sueño que en mi país es casi un imposible”.

A la Dra. Adriana Cristina Cochón, por ser mi consejera de estudio, por estar siempre pendiente de mi tesis y especialmente por sus aportes en el ámbito científico para poner algunas técnicas a punto.

A la Dra. María del Carmen Ríos de Molina, por abrirme las puertas de su laboratorio, sus consejos y principalmente por sus correcciones y sugerencias en esta Tesis en la parte de estrés oxidativo.

A la Dra. Noemí Verrengia Guerrero, por su apoyo incondicional, sus consejos, sus aportes científicos, y sus donaciones con equipos que ayudaron al desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. Fernando Meijide por acompañarme a pescar, donarme peces para poner las técnicas a punto y por el contacto para lograr conseguir los peces con los que desarrolle este trabajo.

A los CPAS del INQUIMAE, especialmente a Vicente Povse por su amistad, disposición, motivación y ayuda en las mediciones. Que tengas un muy buen viaje hacia la eternidad.

Al Hospital Italiano en relación a su colaboración para la cuantificación de plaguicidas y a mi hermana Andrea Bernal por sus aportes y conocimientos en esta temática.

A Marcela Velazco INTECH de Chascomús por ayudarnos en la logística para poder pescar las madrecitas.

A mis compañeros de muestreo del Cuartel V: José, Lu, Facu, Karina, Gisella, Ro y Laura por hacer agradable y ameno las largas jornadas de trabajo. A Verónica Eugenia Zimmer, técnica del IMDEL por su amistad, por acompañarnos en todos los muestreos y trabajar con nosotros de manera incondicional. A todos ellos gracias, pero especialmente a Laura Raiger por hacerme parte del proyecto PUE.

A las chinitas del laboratorio: Anita, Ceci, Anto y Carmín por las tardes de mate, de charlas, risas y consejos en los momentos más difíciles que hicieron más ameno el trabajo. A Carmín y Anto que al compartir con ustedes el desarrollo de las técnicas de estrés oxidativo me ayudó a apropiarme mejor de cada una de ellas.

Al grupo de trabajo de (LEEM- INQUIBICEN) por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme usar los equipos como una integrante más del laboratorio. A Gabi, Sebas y a Tati por sus consejos y recomendaciones para poner las técnicas a punto.

A mis amigos fuera del laboratorio, Raúl (el gato) y Marichu, Laura Martínez, por estar siempre presentes al lado del cañón, por su amistad y poner el hombro en los momentos difíciles.

A mis amigos colombianos: Luz Beltrán por estar siempre pendiente de mí y apoyarme a pesar de la distancia. André y Dani por su amistad, calor colombiano e incondicionalidad. A ellos muchas gracias por las tardecitas de café con arepa.

A mi familia: mis padres Pedro Bernal García y Carmen Rey Mora, por su apoyo incondicional, su amor y palabras de aliento. A mis hermanos Wilman, Norma, Yehison, Andrea y Jenny por confiar en mí, por ser mi inspiración y ejemplo para seguir. Especialmente a mi hermanita gemela “Jenny” por estar siempre a mi lado y ser el amor de mi vida. A mis sobrinos porque a pesar de la distancia y de todas las experiencias de vida perdidas siempre me esperan y reciben con un inmenso amor.

A Julián mi compañero de vida y padre de mi hijo, por su amor, apoyo incondicional, por cuidarme y llenarme de fuerzas y motivos para continuar aún en los momentos difíciles. Mil gracias por siempre estar presente.

A mi familia Argentina, Don Luis y Doña Julia por haberme querido como una hija más, por su esmero y dedicación para cocinar y compartir los fines de semana en familia, por los tupper de comida. A Gabi por ser como un hermano más. A mi hijo Agustín Gigena Bernal porque llegaste en un momento de mucha angustia y dolor para demostrarnos que los milagros existen.

A pesar de que este documento es la última tesis doctoral desarrollada con lugar de trabajo en el laboratorio de aguas (T5) del INQUIMAE, el conocimiento y aptitud científica continuara en el crecimiento profesional de cada uno de los tesistas que tuvimos la oportunidad de ser dirigidos por las doctoras María dos Santos Afonso y Renata Menéndez Helman..... Mil gracias.

Dedicado:

A la memoria de mis gigantes del corazón que lucharon hasta el último momento:

A mi padre Pedro Bernal García y a mis padres argentinos: doña Julia de Giacomo y don Luis Domingo Gigena. Partieron al final de esta travesía, pero son parte de este logro. Mil gracias, siempre los amaré con todo mi corazón.

A mi compañero de vida Julián Gigena y mi hijo Agustín Gigena Bernal por ser un pilar en mi vida.

Tabla de Contenidos

Resumen	2
Summary	4
Agradecimientos.....	6
Abreviaturas.....	14

I.1. Introducción General	16
I.1.1. La importancia del monitoreo ambiental de los ecosistemas acuáticos	18
I.1.2. Efectos de la contaminación ambiental en especies no blanco: los peces como organismos de ensayo	18
I.1.3. Biomarcadores de estrés ambiental	19
I.2. Estructura de la Tesis.....	20
I.3. Hipótesis.....	21
I.4. Objetivo General	21

Capítulo 1: Subcuenca Las Catonas (Partido de Moreno, Provincia De Buenos Aires). Características hidroquímicas y calidad del agua.....	23
--	-----------

1.1. Introducción.....	23
1.1.1. Características fisicoquímicas	26
1.1.2. Calidad del agua	32
1.1.2.1. Eutrofización.....	33
1.1.2.2. Metales.....	33
1.1.2.3. Plaguicidas	33
1.2. Hipótesis	35
1.3. Objetivos específicos:	35
1.4. Materiales y métodos	35
1.4.1. Sitio de Estudio	35
1.4.2. Determinación de parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i> y en laboratorio.	37
1.4.2.1. Metodologías analíticas	39
1.4.3. Análisis de diagramas hidroquímicos	40
1.4.3.1. Diagrama de calcita a diferentes presiones parciales de CO ₂	40
1.4.3.2. Diagrama de Piper Hill Langelier	41
1.4.3.3. Diagrama de Stiff.....	42
1.4.3.4. Diagrama de Gibbs.....	43
1.4.3.5. Diagrama de Schoeller-Berkaloff.....	45
1.4.4. Determinación de Metales	45
1.4.5. Identificación y cuantificación de plaguicidas	45
1.4.6. Análisis estadístico.	49
1.4.6.1. Correlación estadística y análisis multivariado de parámetros.	50
1.4.6.1.1. Análisis de componentes principales (PCA)	50
1.4.6.1.2. Análisis clúster	50
1.5. Resultados.....	51
1.5.1. Caracterización hidroquímica.....	51
1.5.2. Parámetros climáticos y variaciones del caudal en los sitios de muestreo ..	55
1.5.3. Características fisicoquímicas de los sitios de muestreo durante las diferentes estaciones del año.	57
1.5.3.1. Análisis multivariado de los parámetros fisicoquímicos	60

1.5.3.1.1. Análisis de los parámetros fisicoquímicos mediante PCA	60
1.5.3.1.2. Variación estacional de los parámetros fisicoquímicos en los sitios de muestreo (PCA, clúster).....	63
1.5.4. Análisis del estado de eutrofización del cuerpo de agua	65
1.5.5. Metales	67
1.5.6. Plaguicidas	70
1.6. Discusión	74
1.7. Conclusiones.....	82

Capítulo 2. Evaluación de neurotoxicidad: Efectos de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en peces dulceacuícolas 85

2.1. Introducción.....	85
2.1.1. Plaguicidas organofosforados	86
2.1.1.1. Herbicidas organofosforados.....	89
2.1.1.2. Insecticidas organofosforados	93
2.1.2. Acetilcolinesterasa	97
2.1.2.1. Acetilcolinesterasa como biomarcador de neurotoxicidad.....	100
2.1.3. Peces dulceacuícolas como organismos de ensayo	101
2.1.3.1. <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> como modelo experimental.....	101
2.1.3.2. <i>Gambusia affinis</i> como modelo experimental	103
2.2. Hipótesis	105
2.3. Objetivos específicos.....	105
2.4. Materiales y métodos	105
2.4.1. Organismos de ensayo	105
2.4.2. Diseño experimental	106
2.4.2.1. Efectos neurotóxicos y capacidad de recuperación en <i>C. decemmaculatus</i> . Bioensayos agudos de exposición a concentraciones subletales de clorpirifós y glifosato.	106
2.4.2.2. Bioensayos agudos de exposición a concentraciones subletales de clorpirifós para evaluar comparativamente la diferencia de susceptibilidad de <i>C. decemmaculatus</i> y <i>G. affinis</i>	110
2.4.2.3. Ensayos <i>in vitro</i> : Co-incubación de homogenatos de <i>C. decemmaculatus</i> y <i>G. affinis</i> con clorpirifós oxón.	111
2.4.2.4. Ensayos <i>in vitro</i> : Co-incubación de homogenatos de <i>C. decemmaculatus</i> con glifosato y ácido aminometilfosfónico.	113
2.4.3. Preparación de homogenatos	117
2.4.4. Determinaciones analíticas	118
2.4.4.1. Actividad enzimática: Acetilcolinesterasa (AChE)	118
2.4.4.2. Determinación de la concentración de proteínas tisulares	120
2.4.4.3. Determinación de las concentraciones de plaguicidas en los medios de ensayo	120
2.4.5. Expresión de los resultados y análisis estadístico.....	121
2.4.6. Reactivos	122
2.5. Resultados	124
2.5.1. Caracterización de los niveles basales de acetilcolinesterasa en los organismos de ensayo.....	124
2.5.2. Evaluación de efectos y capacidad de recuperación de la actividad de acetilcolinesterasa en <i>C. decemmaculatus</i> después de la exposición <i>in vivo</i> a glifosato y a clorpirifós	125

2.5.2.1. Actividad de acetilcolinesterasa en <i>C. decemmaculatus</i> después de la exposición a glifosato. Evaluación de efectos y capacidad de recuperación. .	125
2.5.2.2. Actividad de acetilcolinesterasa en <i>C. decemmaculatus</i> después de la exposición a clorpirifós. Evaluación de efectos y capacidad de recuperación. .	128
2.5.3. Evaluación de la susceptibilidad diferencial de la exposición <i>in vivo</i> a clorpirifós (CPF) sobre la actividad de acetilcolinesterasa en <i>C. decemmaculatus</i> y <i>G. affinis</i>	131
2.5.4. Evaluación de la sensibilidad diferencial de la enzima acetilcolinesterasa al clorpirifós oxón en <i>C. decemmaculatus</i> y <i>G. affinis</i>). Ensayos <i>in vitro</i>	133
2.5.5. Análisis de mecanismos de inhibición. Efectos de la exposición <i>in vitro</i> a glifosato y a ácido aminometilfosfónico sobre la actividad de acetilcolinesterasa en homogenatos de <i>C. decemmaculatus</i>	134
2.6. Discusión	137
2.7. Conclusiones.....	144

Capítulo 3. Evaluación de los efectos de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre parámetros de estrés oxidativo en *Cnesterodon decemmaculatus*..... 147

3.1. Introducción.....	147
3.1.1. Plaguicidas organofosforados y mecanismos de inducción de estrés oxidativo	147
3.1.2. Especies reactivas de oxígeno (EROs)	149
3.1.3. Defensas Antioxidantes	150
3.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos	151
3.1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos	152
3.1.4. Daño oxidativo	153
3.2. Hipótesis	153
3.3. Objetivos específicos.....	153
3.4. Materiales y métodos	154
3.4.1. Organismo de ensayo: <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	154
3.4.2. Bioensayos agudos de exposición a concentraciones subletales de glifosato y clorpirifós, para la determinación de efectos en parámetros biomarcadores de estrés oxidativo, en <i>C. decemmaculatus</i>	154
3.4.3. Preparación de homogenatos	156
3.4.4. Determinación de biomarcadores de defensas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo.....	159
3.4.4.1. Actividad de la enzima catalasa.....	159
3.4.4.2. Actividad de superóxido dismutasa	160
3.4.4.3. Contenido de glutatión total	161
3.4.4.4. Glutatión-S-Transferasa	162
3.4.4.5. Estimación de los niveles de peroxidación lipídica (contenido de TBARS).....	163
3.4.4.6. Determinación de la concentración de proteínas tisulares	164
3.4.5. Análisis estadístico	164
3.5. Resultados	164
3.5.1. Efecto de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre parámetros de estrés oxidativo	166
3.5.1.1. Efecto de la exposición a glifosato sobre parámetros de estrés oxidativo en <i>C. decemmaculatus</i>	166
3.5.1.1.1. Actividad de catalasa	167

3.5.1.1.2. Niveles de glutatión total	168
3.5.1.1.3. Actividad de glutatión-S-transferasa.....	170
3.5.1.1.4. Actividad de superóxido dismutasa	172
3.5.1.1.5. Estimación de procesos de peroxidación lipídica	174
3.5.1.1.6. Concentraciones analíticas de glifosato en las soluciones de los bioensayos	176
3.5.1.2. Efecto de la exposición a clorpirifós sobre parámetros de estrés oxidativo.....	177
3.5.1.2.1. Actividad de catalasa	178
3.5.1.2.2. Niveles de glutatión total	179
3.5.1.2.3. Actividad de glutatión-S-transferasa.....	181
3.5.1.2.4. Actividad de superóxido dismutasa	183
3.5.1.2.5. Estimación de procesos de peroxidación lipídica	185
3.5.1.2.6. Concentraciones analíticas de clorpirifós en las soluciones de los bioensayos	187
3.6. Discusión	188
3.6.1. Alteraciones de defensas antioxidantes, la actividad de la enzima detoxificante glutatión-S-transferasa y marcadores de estrés oxidativo después de la exposición a glifosato.....	188
3.6.2. Alteraciones de defensas antioxidantes, actividad de la enzima detoxificante glutatión-S-transferasa y marcadores de estrés oxidativo después de la exposición a clorpirifós.	191
3.7. Conclusiones.....	195

Capítulo 4: Evaluación de los efectos de la exposición a contaminantes ambientales sobre parámetros de neurotoxicidad y estrés oxidativo en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>.....	197
4.1. Introducción.....	197
4.2. Hipótesis	199
4.3. Objetivos específicos.....	200
4.4. Materiales y métodos	200
4.4.1. Organismo de ensayo: <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	200
4.4.2. Bioensayo agudo de exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas para la determinación de efectos sobre parámetros biomarcadores en <i>C.</i> <i>decemmaculatus</i>	201
4.4.3. Preparación de homogenatos y determinación de biomarcadores de defensas antioxidantes y de estrés oxidativo.	203
4.4.4. Análisis estadístico	204
4.5. Resultados.....	204
4.5.1. ..Parámetros fisicoquímicos, cuantificación de plaguicidas, metales y calidad del agua en las muestras ambientales	204
4.5.2.Efecto de exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas sobre parámetros biomarcadores en <i>C. decemmaculatus</i>	208
4.5.2.1. Evaluación del efecto de la exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas sobre la actividad de acetilcolinesterasa en <i>C decemmaculatus</i>	209
4.5.2.2. Efecto de la exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas sobre parámetros de estrés oxidativo en <i>C decemmaculatus</i>	210
4.5.2.2.1. Actividad de catalasa	210
4.5.2.2.2. Niveles de glutatión total	212
4.5.2.2.3. Actividad de glutatión-S-transferasa.....	214

4.5.2.2.4. Actividad de superóxido dismutasa	216
4.5.2.2.5. Estimación de los niveles de peroxidación lipídica (contenido de TBARS)	218
4.5.2.2.6. Concentraciones de clorpirifós y glifosato determinadas en las soluciones del agua de la subcuenca Las Catonas utilizadas en el bioensayo	220
4.6. Discusión	223
4.7. Conclusiones.....	227
Conclusiones generales.....	229
Anexos.....	232
Bibliografía.....	247

Abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterasa
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro
Alk	Alcalinidad
AMBA	Área Metropolitana de Buenos Aires
AMPA	Ácido aminométilfosfónico
AMD	Agua Moderadamente Dura
BANT	Biotero de Animales No Tradicionales
CABA	Ciudad Autónoma de Buenos Aires
CASAFE	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes
CAT	Catalasa
CPF	Clorpirifós (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato);
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DTNB	5-5'-ditiobis (2-nitro-ácido benzoico)
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FA	Fracción Anterior
FM	Fracción Media
FP	Fracción Posterior
GSH	Glutatión
GST	Glutatión-S-transferasa
ICA	Índice de Calidad de Agua
INA	Instituto Nacional del Agua
IRAM	Instituto Argentino de Normalización y Certificación
K	Factor de condición
L_T	Longitud Total
MAGyP	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
NiT	Nitrógeno Inorgánico Total
P_c	Peso Corporal
PCA	Análisis de Componentes Principales
PiT	Fósforo Inorgánico Total
PMG	Glifosato, (N-(fosfonometil) glicina
RMBA	Región Metropolitana de Buenos Aires
RNA	Ácido ribonucleico
SGA	Secretaría de Gestión Ambiental
SOD	Superóxido Dismutasa
SRHN	Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación
TBARS	Especies rectivas al ácido tiobarbitúrico
TDS	Sólidos Disueltos Totales
t-GSH	Contenido de glutatión total
TNB	Ácido 5 tio-2-nitrobenzoico
US EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

Introducción General

I.1. Introducción General

En Argentina, al igual que en muchos países de América Latina, se han generado grandes transformaciones en las prácticas agrícolas. La producción y distribución de alimentos es manejada a gran escala y destinada casi con exclusividad al mercado exterior (Mikkelsen, 2008). Este modelo ha generado el cambio más notorio que experimentó la agricultura a lo largo del siglo XX, donde se reemplazaron las tierras naturales y ganaderas por tierras agrícolas (Timm, 2004), proceso conocido como la expansión de la frontera agrícola.

En el país, la superficie de tierras destinadas a la siembra (principalmente de cultivos de soja) ha aumentado de aproximadamente 43 millones a más de 95 millones de hectáreas desde los años 70 hasta el 2019, según los datos reportados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina (MAGyP, 2020). Sin embargo, la expansión de la frontera no ha sido uniforme ya que el mayor avance se registró en el centro del país. La región pampeana fue donde se produjo una mayor expansión de cultivos anuales durante el período 1988 - 2002 a expensas de pasturas y remanentes de pastizales naturales (Orúe *et al.*, 2007)

La frontera agrícola en la región pampeana se expandió de manera aleatoria y algo caótica hacia el norte del país a expensas de áreas de bosques y pastizales naturales (Carreño y Viglizzo, 2007). Para sostener estos cambios de la productividad, fueron necesarios más insumos y como consecuencia del incremento de la actividad agrícola se generaron más residuos y desechos que afectan al ambiente (nutrientes, aguas residuales, plaguicidas, antibióticos, etc). Estas transformaciones se generaron sin evaluar los impactos en la ecología y en el ambiente (Zarrilli, 2020).

Desde la década del 90 hasta la actualidad, el modelo de rotación de cultivos con pasturas y forrajeras anuales fue reemplazado por la intensificación agrícola. Este modelo se basó en la incorporación de los cultivos transgénicos, la siembra directa y el consecuente aumento de uso de fertilizantes y plaguicidas (Satorre, 2005; Altieri y Pengue, 2006).

En la actividad agrícola se utilizan una gran variedad de plaguicidas como herbicidas, insecticidas, fungicidas y rodenticidas, de los cuales los dos primeros son los de mayor uso en Argentina (Figura 1). Los plaguicidas se comercializan en diferentes tipos de

formulaciones y en la región pampeana son ampliamente utilizados en la agricultura (CASAFE, 2014).

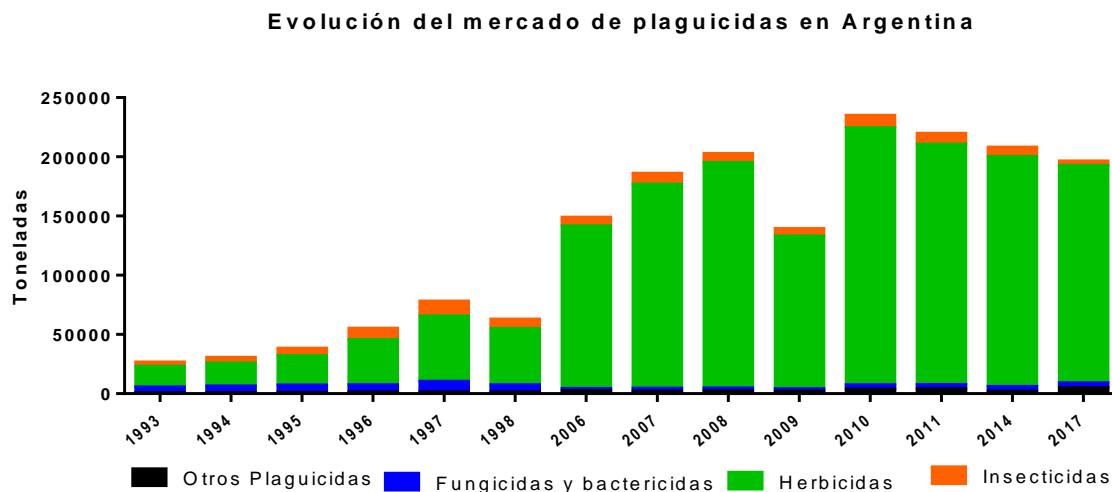


Figura 1. Evolución del mercado de plaguicidas en Argentina. La gráfica se elaboró con los datos reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2020).

El uso de herbicidas en la agricultura aumentó en Argentina de 17.533 toneladas en 1993 a más de 180.000 en el 2017 (FAO, 2020). Dentro de los herbicidas más utilizados en el país se encuentran el glifosato, el 2,4 D y la atrazina, siendo el glifosato el más utilizado debido en gran medida a que su empleo resultó cada vez más económico (Souza, 2009; Aparicio *et al.*, 2017). Por otro lado, el uso de insecticidas aumentó de 3.503 toneladas en 1993 a más de 10.000 toneladas en el 2010 (FAO, 2020). Dentro de los insecticidas, el clorpirifós y la cipermetrina son los más utilizados en los cultivos de soja genéticamente modificada (Aparicio *et al.*, 2015).

Aunque una parte de los plaguicidas que son aplicados en los cultivos se degrada debido a factores bióticos, abióticos y a las características fisicoquímicas de la molécula, una fracción puede llegar a ser transportada y alcanzar los cuerpos de agua superficiales (Aparicio *et al.*, 2013), lo cual perjudica al sistema natural incluyendo a las especies que allí residen. Considerando la amplia utilización de plaguicidas en el país, resulta relevante caracterizar el destino de los mismo, su concentración en ambientes acuáticos, y al mismo tiempo evaluar la toxicidad no prevista sobre especies no blanco, como los peces de agua dulce.

I.1.1. La importancia del monitoreo ambiental de los ecosistemas acuáticos

El sistema acuático es el receptor final de todos los contaminantes de origen natural o antropogénico. La urbanización y la explotación agropecuaria intensiva producen aportes excesivos de nutrientes en cuerpos de agua lenticos que generan procesos de contaminación ambiental que, a su vez, causan degradación en los diferentes compartimentos ambientales (Salibián, 2006; Fernández Cirelli, 2012).

El monitoreo y la evaluación de la calidad del agua de los ecosistemas acuáticos es un instrumento que permite mantener y actualizar el diagnóstico de una situación específica, así como la identificación de los impactos ambientales y el conocimiento de la variación o degradación del ambiente en el tiempo a partir de las características del medio o entorno de un ecosistema. Se observan y miden varios parámetros evaluados según los indicadores más significativos que pueden describir un proceso natural o antrópico y de modo de evidenciar el comportamiento de un sistema natural o intervenido por el hombre (Brooks *et al.*, 2006).

La determinación de la composición química de los cuerpos de agua naturales, así como de los parámetros fisicoquímicos, pueden no contemplar en forma íntegra a los diferentes contaminantes que ingresan al sistema o sus intermitencias. En este sentido, diferentes autores han complementado los estudios de monitoreo ambiental con la caracterización toxicológica mediante bioensayos de laboratorio, utilizando especies nativas como organismos de ensayo (de la Torre *et al.*, 2005; Castañé *et al.*, 2013; Ferrari, 2015; Wieczerzak *et al.*, 2016; Baudou *et al.*, 2019).

I.1.2. Efectos de la contaminación ambiental en especies no blanco: los peces como organismos de ensayo

En los cuerpos de agua receptores, diferentes mecanismos homeostáticos permiten que los contaminantes puedan ser asimilados sin grandes consecuencias para la biota nativa. Sin embargo, cuando la concentración de los contaminantes alcanza niveles que exceden esa capacidad de los cuerpos de agua, la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de los organismos se ven afectados (Brooks *et al.*, 2006).

Los organismos acuáticos, como los peces, pueden estar expuestos a una mezcla de compuestos químicos a partir de diferentes vías: el contacto con el agua, los sedimentos o a través del alimento que ingieren. La toxicidad y la capacidad de acumulación de un

contaminante no solo depende de su concentración total en el ambiente sino también de la facilidad con la que los organismos pueden incorporarlos ya sea a través de las branquias, la piel y el tracto digestivo, así como de las propiedades propias de cada compuesto que afectan su distribución en el organismo (Di Giulio y Hinton, 2008).

Los peces son organismos propicios para efectuar monitoreos ambientales, debido a que responden al impacto ambiental a nivel molecular, tisular o fisiológico (Van der Oost *et al.*, 2003). Por esta razón, son considerados como organismos apropiados para estudios ecotoxicológicos evaluando los efectos de la contaminación (Sharma *et al.*, 2021).

En Argentina, una de las especies nativas empleadas como modelo experimental en estudios ecotoxicológicos es *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). Este pez es nativo de Sudamérica, donde habita tanto en ambientes prístinos como severamente degradados (Hued y Bistoni, 2005; Maggioni *et al.*, 2012). Su distribución es extensa, comprendiendo el sur de Brasil, Uruguay y centro de Argentina (Lucinda, 2005), donde presenta una alta densidad en ríos y arroyos incluido el río Reconquista (Ferrari, 2015). En los últimos años ha aumentado el número de investigaciones en las que se ha utilizado a esta especie y se la propone como organismo apropiado para ser utilizado en estudios de evaluación de toxicidad y biomonitordeo (IRAM, 2008; Ferrari *et al.*, 2017).

I.1.3. Biomarcadores de estrés ambiental

Los cuerpos de agua pueden ser depositarios de diferentes contaminantes que pueden ocasionar efectos adversos sobre la biota sin llegar a ser percibidos sino hasta que sus daños se manifiesten a nivel poblacional o ecosistémico. Diferentes autores han propuesto el uso de biomarcadores como una estrategia para evaluar el impacto temprano de los contaminantes incluso a concentraciones bajas o subletales (Van der Oost *et al.*, 2003; Linde-Arias *et al.*, 2008; Baudou *et al.*, 2019; Gupta, 2019; Kunter *et al.*, 2019). Se ha definido como *biomarcador* a un parámetro cuya alteración refleja la interacción entre un sistema biológico y un estresor ambiental ya sea de carácter químico, físico, biológico, o la interacción de varios de ellos (OMS, 1993; Van der Oost *et al.*, 2003). Los biomarcadores han sido divididos en tres categorías. En primer lugar, *biomarcadores de exposición*, que indican si el contaminante presente en el medio ingresó al organismo a través de la medición del mismo contaminante, de sus metabolitos o del producto de interacción entre el contaminante y una molécula o célula

diana. En segundo lugar, *biomarcadores de efecto*, que incluyen cualquier alteración cuantificable ya sea bioquímica, fisiológica, histológica o de comportamiento ocasionada en el organismo luego de la exposición al contaminante. Por último, *biomarcadores de susceptibilidad*, que indican la capacidad heredada o adquirida del organismo para responder a la exposición a un compuesto tóxico (OMS, 1993; Van der Oost *et al.*, 2003; Gupta, 2014).

La exposición a contaminantes ocasiona en los organismos diferentes respuestas biológicas a nivel celular y subcelular. Por lo tanto, un solo biomarcador no es suficiente para evaluar los efectos específicos de estos compuestos sobre los organismos. El estudio de diferentes biomarcadores es fundamental para la comprensión de las diferentes respuestas biológicas involucradas en los organismos expuestos a un determinado estresor (Van der Oost *et al.*, 2003). Desde hace varios años, los parámetros biomarcadores han sido una herramienta de gran relevancia para la evaluación ecotoxicológica de los sistemas acuáticos (Van der Oost *et al.*, 2003; Sanchez y Porcher, 2009; Kroon *et al.*, 2017; Gupta 2019).

I.2. Estructura de la Tesis

El desarrollo de esta Tesis fue organizado en 4 capítulos. En el Capítulo 1 se realizó la caracterización hidroquímica y se analizaron las variaciones espaciales y estacionales en la composición fisicoquímica del agua superficial de tres sitios de un arroyo de la subcuenca Las Catonas (cuenca del Río Reconquista, Provincia de Buenos Aires) con diferente impacto antrópico. Asimismo, se determinó la calidad del agua y el estado de eutrofización, y se evaluó la presencia de metales y de plaguicidas.

A partir de los resultados obtenidos para los plaguicidas y teniendo en cuenta aquellos asociados a los cultivos de gran relevancia económica en la región pampeana, se seleccionaron dos plaguicidas (glifosato y clorpirifós) en concentraciones de relevancia ambiental para estudiar los efectos ecotoxicológicos en especies no blanco (Capítulos 2 y 3).

Particularmente, en el Capítulo 2, se evaluaron efectos neurotóxicos: los cambios y la capacidad de recuperación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en *Cnesterodon decemmaculatus* después de la exposición a concentraciones subletales de estos plaguicidas. Además, se comparó la susceptibilidad diferencial a la exposición

in vivo a clorpirifós sobre la actividad de AChE de *C. decemmaculatus* con otro poecílido (*Gambusia affinis*), y se evaluó mediante ensayos *in vitro* la diferencia de sensibilidad de la enzima presente en ambas especies. Finalmente, se realizó un análisis exploratorio de los mecanismos de neurotoxicidad para el glifosato.

En el Capítulo 3 se determinaron parámetros de estrés oxidativo, alteraciones en defensas enzimáticas, no enzimáticas y la peroxidación lipídica en *C. decemmaculatus* después de la exposición a los plaguicidas seleccionados.

Finalmente, en el Capítulo 4 se evaluó la existencia de efectos neurotóxicos y de estrés oxidativo en *C. decemmaculatus* después de la exposición a muestras ambientales de dos de los sitios estudiados de la subcuenca Las Catonas (el ubicado cercano a una zona residencial y el lindero a una zona hortícola).

I.3. Hipótesis

Las aguas superficiales en zonas impactadas por actividad agropecuaria presentan un aumento en los niveles de plaguicidas, nutrientes y otros compuestos. Estos contaminantes ocasionan efectos adversos en la ictiofauna que habita esos cuerpos de agua que pueden ser evaluados a través de diferentes parámetros biomarcadores (de neurotoxicidad, de estrés oxidativo, entre otros). El análisis de estos parámetros permite evaluar en forma integral la calidad ecotoxicológica de dicho cuerpo de agua.

I.4. Objetivo General

Monitorear la calidad fisicoquímica del agua, con énfasis en la identificación y cuantificación de diferentes plaguicidas, en un cuerpo de agua superficial de la subcuenca Las Catonas de la Provincia de Buenos Aires y evaluar potenciales efectos adversos sobre peces dulceacuícolas.

Capítulo 1

Capítulo 1: Subcuenca Las Catonas (Partido de Moreno, Provincia De Buenos Aires). Características hidroquímicas y calidad del agua.

1.1. Introducción

La Región Metropolitana de Buenos Aires (RMBA) abarca la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) (Figura 2). Se encuentra localizada dentro de la llanura pampeana de la Argentina, una de las grandes planicies a nivel mundial que presenta una escasa pendiente hacia el mar. El río Reconquista forma parte de una de las tres grandes cuencas de la RMBA (junto a la cuenca del Río Luján y la cuenca Matanza Riachuelo) (Figura 2). Su desembocadura y escurrimiento es hacia los ríos Paraná y de la Plata y aporta un tercio de la contaminación de este último río, el cual provee agua potable a la Ciudad de Buenos Aires y sus alrededores.

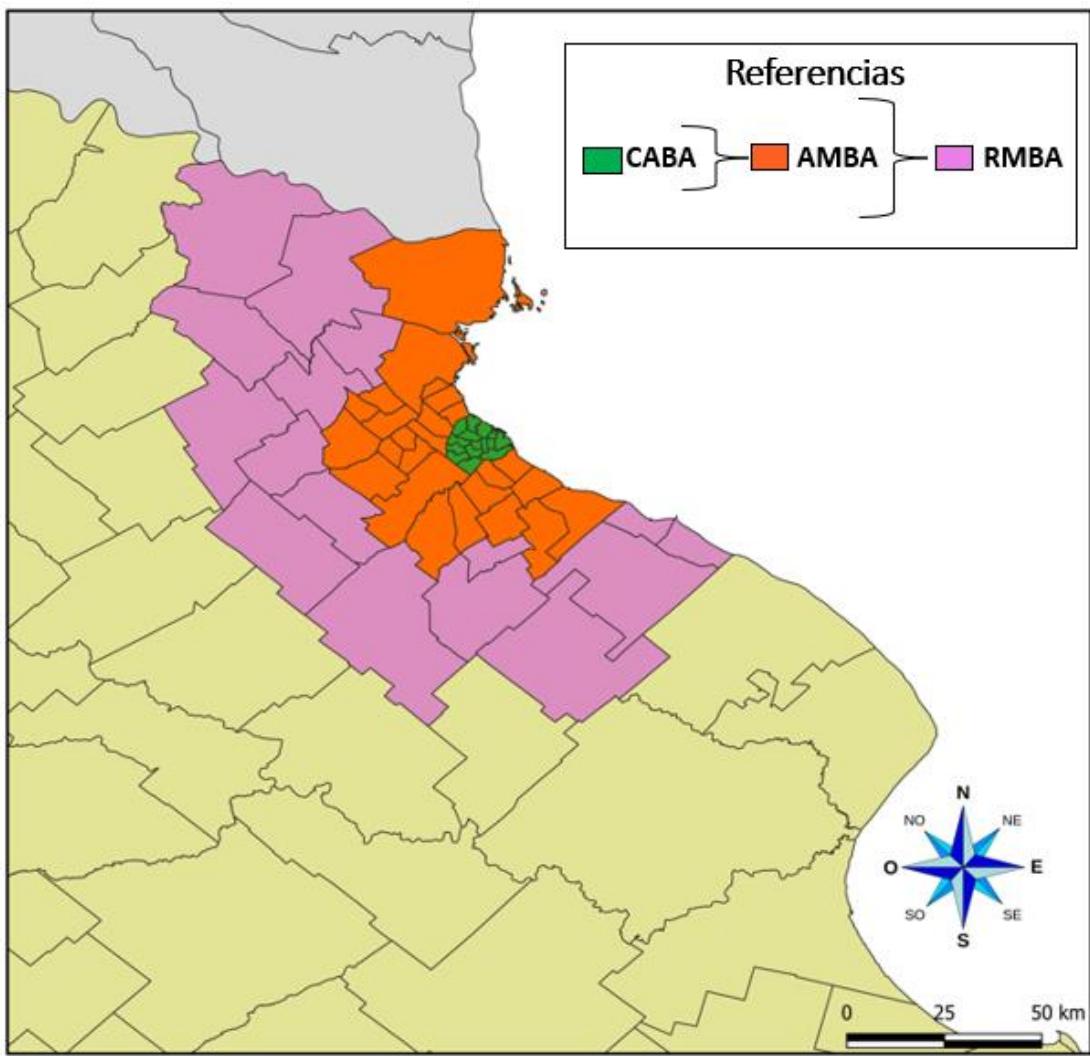


Figura 2. Mapa de la ciudad de Buenos Aires, área metropolitana de Buenos Aires, región metropolitana de Buenos Aires y la Provincia de Buenos Aires. CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires. AMBA: Área Metropolitana de Buenos Aires, RMBA: Región Metropolitana de Buenos Aires. *Mapa elaborado con el programa QGIS 3.6.*

En la Figura 3 se describe la cuenca del río Reconquista que se origina en la confluencia de los arroyos El Durazno, La Choza y el arroyo Arias. En esta cuenca se encuentra la represa Ingeniero Roggero creada en 1971 para regular el cauce de estos cuerpos de agua por las crecidas (Tauber *et al.*, 2011). El arroyo Las Catonas es uno de los principales tributarios del río Reconquista. La subcuenca Las Catonas tiene una superficie de 146 Km², comprendidos casi en su totalidad en el Partido de Moreno (Miraglia *et al.*, 2005). El arroyo Las Catonas y el arroyo Morón vierten sus aguas en la cuenca media. Aguas abajo del arroyo Morón se inicia la cuenca inferior, que se extiende hasta las terrazas bajas del valle Luján donde el cauce se bifurca en los ríos Tigre y Reconquista Chico y en un canal artificial que ingresa al Delta (Defensor del pueblo de la nación *et al.*, 2007).

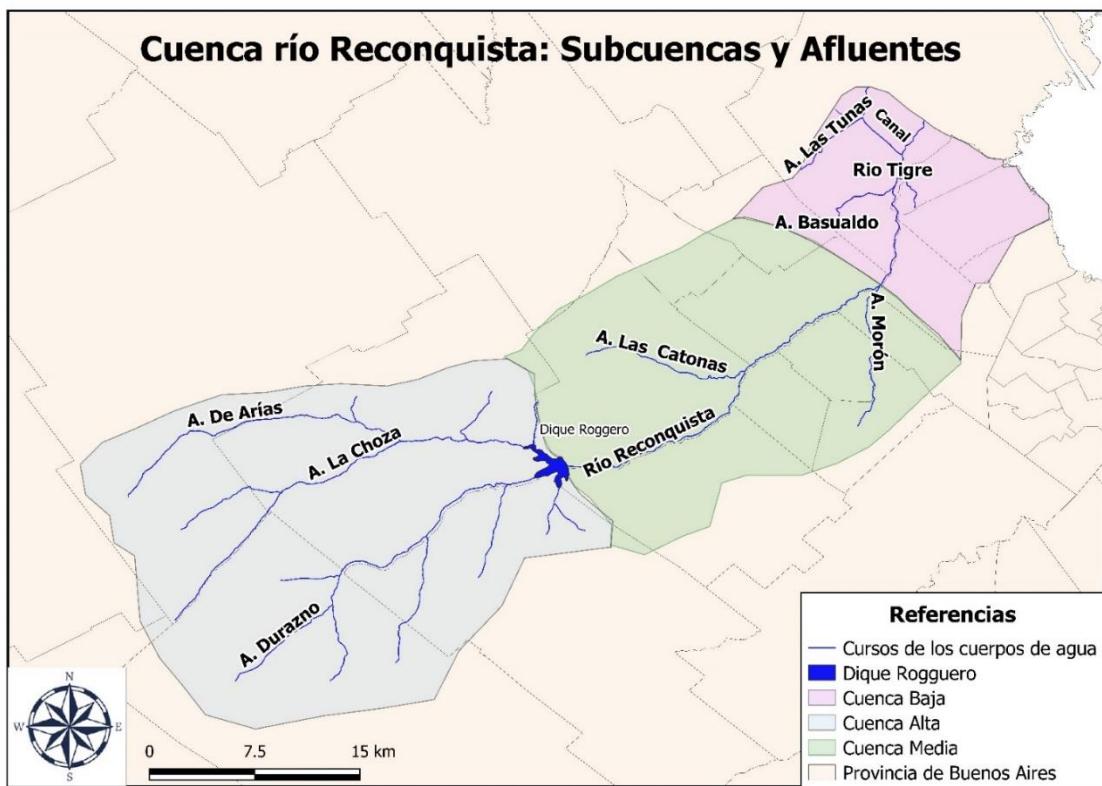


Figura 3. Cuenca Río Reconquista, subcuenca y afluentes. *Mapa elaborado con el programa QGIS 3.6*

Los arroyos, al igual que los ríos, son sistemas abiertos que cambian a lo largo del tiempo y de su curso debido a la influencia del clima y de las características de la cuenca (Marbán *et al.*, 1999). Las aguas naturales, así llamadas por ser las que se encuentran conformando los cuerpos de aguas naturales, tienen una gran variedad de sustancias disueltas en el medio y la composición de equilibrio se debe a una serie de complejas reacciones químicas y de procesos fisicoquímicos. La composición química de los sistemas naturales es, entonces, el resultado de innumerables procesos complejos donde intervienen los factores climáticos, fisicoquímicos, hidrogeológicos, entre otros.

Los procesos hidrológicos (precipitación, escorrentía, lixiviación, erosión, entre otros) son factores que influyen en el destino de los contaminantes en los cuerpos de agua, y constituyen los principales caminos de transporte de los mismos, así como el medio para la mayoría de las transformaciones químicas y biológicas. Además, la erosión y la lixiviación proporcionan la base natural o geoquímica del material particulado o disuelto presente en las aguas superficiales y subterráneas (Menéndez y Tarela, 2010). En la Figura 4 se muestran algunos de los procesos principales que influyen en la composición hidroquímica de los cuerpos de agua.

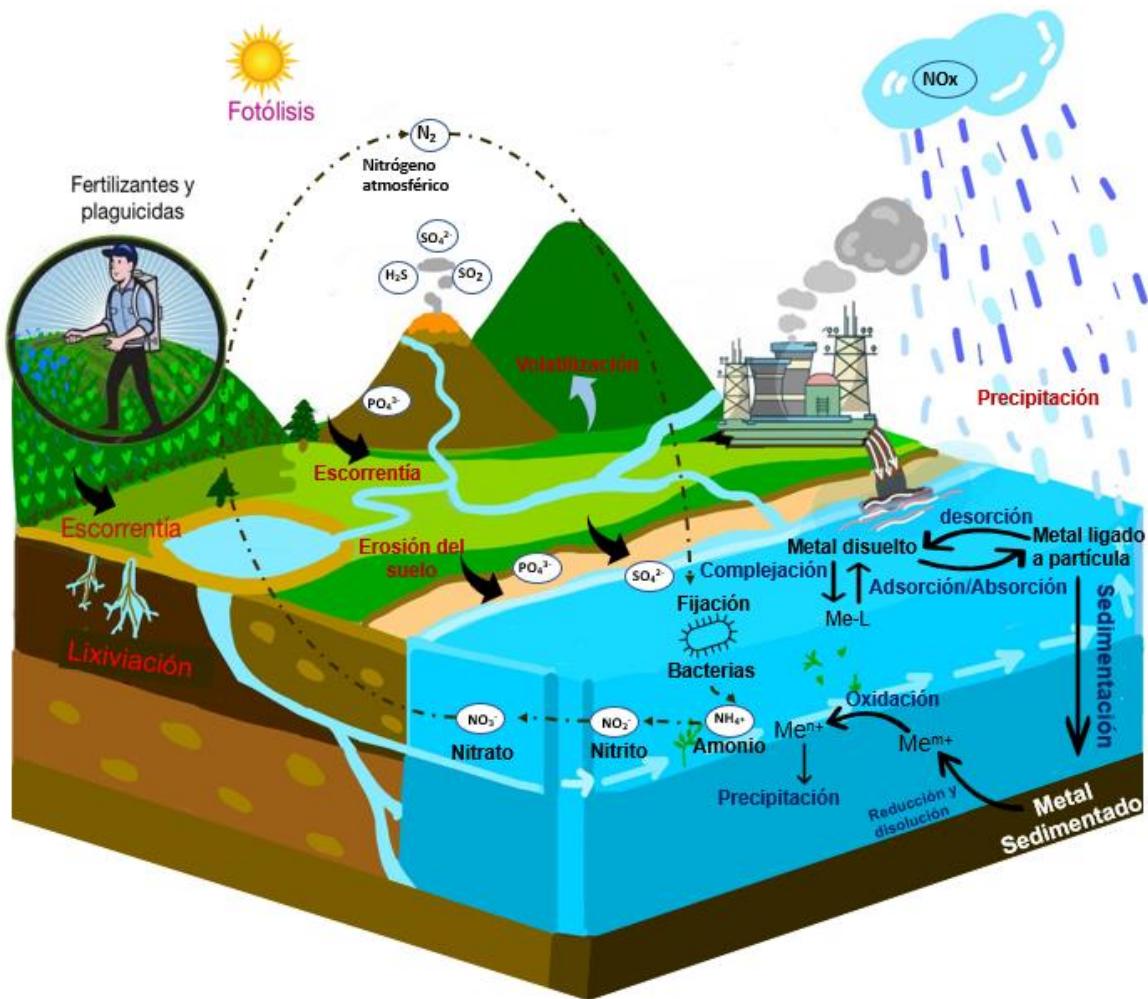


Figura 4. Procesos principales que influyen en la composición hidroquímica de los cuerpos de agua.

1.1.1. Características fisicoquímicas

Existen diferentes factores que determinan los parámetros hidroquímicos de los sistemas acuáticos entre ellos, podemos mencionar los procesos de transferencia entre el agua, la atmósfera y los minerales (Mariño y García, 2018). Todos estos procesos, a los que se suman las reacciones químicas, van a condicionar la composición química de las aguas naturales. En el Anexo 1 se muestran algunos ejemplos de la composición del agua superficial de distintos cuerpos de agua de diferentes partes del mundo.

- **Temperatura**

La temperatura ha sido reconocida como un parámetro ambiental de gran relevancia, tanto en los sistemas acuáticos como en los terrestres, debido a su rol esencial en el desarrollo de la actividad biológica. En los sistemas acuáticos la temperatura influye en

la solubilidad de las sales y de los gases, lo que a su vez retarda o acelera algunos procesos biológicos. Particularmente, al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno (Glynn *et al.*, 1999).

- **Oxígeno disuelto**

El oxígeno disuelto (OD) de los cuerpos de agua es generado a partir de la fotosíntesis, además es incorporado (o eliminado) desde (o hacia) la atmósfera por procesos de difusión, o por acción de las olas y del viento que aumentan la superficie de contacto para el intercambio de oxígeno entre la fase líquida y la gaseosa (Stumm y Morgan, 1996).

La salinidad y la temperatura del agua influyen de manera inversa en los valores del OD. La contaminación del agua por materia orgánica favorece el crecimiento de bacterias que por procesos de respiración disminuyen los niveles de oxígeno presentes en el sistema acuático (Orozco *et al.*, 2003).

- **Potencial de hidrógeno (pH)**

Los cuerpos de agua no contaminados presentan un amplio rango de valores de pH, desde menor a 4 en lagos ácidos, hasta 9-12 en lagos alcalinos y 8,1-8,3 en océanos (Stumm y Morgan, 1996; Álvarez-Borrego, 2007). La variación del pH en los sistemas acuáticos puede generar efectos sobre la biota, ocasionando impacto sobre cada uno de los niveles de organización, desde el celular hasta los ecosistemas (Glynn *et al.*, 1999). Este parámetro influye en procesos de precipitación-disolución, adsorción, biogeoquímicos y reacciones redox (Stumm y Morgan, 1996; Soetaert *et al.*, 2007).

- **Conductividad**

La conductividad eléctrica refleja el grado de mineralización del agua. Es un indicador del grado de salinidad y de la presencia de fertilizantes inorgánicos (potasio, cloruros y sulfatos). Algunos autores han catalogado a este parámetro como uno de los mejores en evaluar la calidad del agua a partir de la actividad antropogénica (Primavesi, 2002).

- **Sólidos disueltos totales**

Los sólidos disueltos totales (TDS) son una medida de la cantidad de iones disueltos presentes en el cuerpo de agua, tanto de cationes como de aniones. Sus concentraciones determinan la turbidez y la transparencia del cuerpo de agua. Además, la cantidad de TDS puede estar influenciada por las actividades que allí se desarrollan, ya que los sistemas acuáticos presentan una capacidad limitada para degradar total o parcialmente algunas de las sustancias de origen antrópico debido a las diferencias entre los procesos de generación y degradación de estas (Orozco *et al.*, 2003). La incorporación de una gran cantidad de nutrientes y materia orgánica en los cursos de agua da como resultado la alteración de las propiedades químicas, físicas y biológicas (Köchling *et al.* 2017).

- **Turbidez**

La turbidez ha sido definida como una medida del grado de pérdida de transparencia del cuerpo de agua debido a la presencia de material particulado y coloides en suspensión, tanto de composición orgánica como inorgánica, que interfiere con el paso de la luz a través del agua (Bloomfield, 2002).

- **Alcalinidad**

Se define a la alcalinidad (Alk) como la capacidad de un sistema acuático de neutralizar ácidos. Es la cantidad necesaria de ácido fuerte añadido hasta conseguir un pH comprendido entre 4,5 y 4,8 coincidiendo con el punto de equivalencia del dióxido de carbono (CO_2) disuelto (Appelo *et al.*, 2004) y es igual a la suma de cationes conservativos menos la suma de aniones conservativos (Ecuación 1.1):

$$\text{Alk} = \sum \text{cationes conservativos} (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - \sum \text{aniones conservativos} (\text{Cl}^-; \text{SO}_4^{2-}; \text{NO}_3^-) = (\text{HCO}_3^-) + 2(\text{CO}_3^{2-}) + (\text{OH}^-) - (\text{H}^+) \quad [1.1]$$

La alcalinidad es una cantidad conservativa que no cambia frente a variaciones de temperatura, presión o pH. Este parámetro en los sistemas acuáticos se debe principalmente a la presencia de los carbonatos, bicarbonatos y bases fuertes (Sawyer *et al.*, 2001). La presencia de los iones de bicarbonato y carbonatos en el agua deriva principalmente de la atmósfera, del suelo rico en CO_2 y de la disolución de las rocas carbonatadas como la calcita. Cabe mencionar que la concentración de CO_2 en el suelo

se incrementa por la respiración de las plantas, la fauna presente en el suelo, y la microfauna y microflora (Orjuela, 2018).

- **Demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO)**

La materia orgánica que se encuentra en los sistemas naturales puede ser originada por el lavado de los suelos en los procesos de escorrentía ocasionados por la lluvia, por la descomposición del material biológico procedente de animales, plantas y microorganismos y de los desechos domésticos, agrícolas e industriales (Spence *et al.* 2011). Una forma de determinar indirectamente la concentración de materia orgánica en el agua es a partir de la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO).

La DQO es un estimador de la cantidad de materia orgánica susceptible de ser oxidada por medios químicos en una muestra. Por otro lado, la DBO es la cantidad de oxígeno consumido al degradar la materia orgánica de una muestra por una población bacteriana en condiciones en las que se han inhibido los procesos de fotosíntesis. El valor de la DBO es inferior al valor de la DQO, ya que estima la materia orgánica susceptible de ser biodegradada. La concentración de DBO es inversa a la del OD, ya que el alto contenido de materia orgánica promueve su degradación por acción de las bacterias aeróbicas, reduciendo el nivel de OD. Tanto la DQO como la DBO se expresan en mg O₂ x L⁻¹.

- **Dureza**

La dureza es la concentración total de los iones de calcio y magnesio. Estos cationes se encuentran en los cuerpos de agua por la lixiviación de los terrenos calizos, dilución de calizas, dolomitas y yesos, o por acción del CO₂ atmosférico (Niera, 2006). En sistemas naturales, las aguas se clasifican según su dureza, dada la concentración de carbonato de calcio que presentan (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las aguas en función de la dureza

Clasificación	Rango de concentración de carbonato de calcio
Aguas blandas	0 a 75 mg CaCO ₃ × L ⁻¹
Aguas moderadamente duras	75 – 150 mg CaCO ₃ × L ⁻¹
Aguas duras	150 – 300 mg CaCO ₃ × L ⁻¹
Aguas muy duras	>300 mg CaCO ₃ × L ⁻¹

Datos tomados de Sawyer *et al.* (2001).

- **Iones mayoritarios**

La salinidad de las aguas superficiales de los sistemas acuáticos continentales está determinada principalmente por la presencia de los aniones Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻ y los cationes Na⁺, Ca²⁺, K⁺ y Mg²⁺. La composición de estos iones está relacionada con los procesos de meteorización de rocas, la precipitación atmosférica y el equilibrio precipitación-evaporación (Kilham, 1990).

Las concentraciones de SO₄²⁻ y Cl⁻ son conservativas, es decir, permanecen inalteradas por cambios en el pH. En cambio, las concentraciones de HCO₃⁻ y CO₃²⁻ son no conservativas ya que dependen de procesos de precipitación, disolución, metabolismo microbiano y cambios climáticos. Al mismo tiempo, la composición de los iones en los cuerpos de agua puede ser alterada por la presencia de focos contaminantes (Straskraba *et al.*, 1999).

El principal aporte en el sistema acuático proviene de la disolución de las rocas como el yeso, cuya composición es de sulfato de calcio. La concentración de sulfatos puede variar entre 2 y 150 mg SO₄²⁻ × L⁻¹ en cuerpos de agua dulce (Mariño y García, 2018).

La disolución del CO₂ atmosférico y de las rocas como la dolomita y la calcita son la principal fuente del bicarbonato y carbonato en los cuerpos de agua (Stumm y Morgan, 1996). En sistemas acuáticos con pH inferior a 8,3, la especie dominante es el bicarbonato (IGME, 1985) y la concentración suele variar entre 50 y 400 mg HCO₃⁻ × L⁻¹.

El potasio puede provenir de los procesos de meteorización de las rocas o por la solubilidad de las sales (IGME, 1985).

El sodio proviene de procesos de meteorización de silicatos y de la disolución de las rocas sedimentarias. En cuerpos de agua dulce, las concentraciones de sodio no suelen sobrepasar los $150 \text{ mg Na}^+ \times \text{L}^{-1}$, sin embargo, se ha descripto para las lagunas pampásicas concentraciones más elevadas de hasta $12182 \text{ mg Na}^+ \times \text{L}^{-1}$ (Volpedo y Fernández Cirelli, 2013).

La principal fuente de calcio en los cuerpos de agua es por la disolución de las rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias. En cuerpos de agua dulce se puede encontrar en un rango de concentración de 10 a $250 \text{ mg Ca}^{2+} \times \text{L}^{-1}$ (IGME, 1985).

El magnesio proviene de la disolución de las rocas carbonatadas como la dolomita y evaporitas. En cuerpos de agua naturales las concentraciones no suelen sobrepasar los $40 \text{ mg Mg}^{2+} \times \text{L}^{-1}$ (Mariño y García, 2018).

- **Nitrógeno**

En los sistemas acuáticos, el nitrógeno se encuentra como NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , N_2O , NO , N_2 , y nitrógeno orgánico en macromoléculas como proteínas, ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), humus, entre otros. Estos compuestos provienen principalmente de la degradación de la materia orgánica muerta. Por acción de las bacterias, el N_2 atmosférico es transformado en NH_3 , el cual es tomado por los vegetales al igual que el NO_3^- ; NO_2^- y son convertidos en material biológico. El nitrógeno orgánico que proviene de la degradación del material biológico y de los desechos de animales, se transforman en NH_4^+ , por acción de bacterias y hongos. Otra fuente de nitrógeno está relacionada con la actividad antrópica, proveniente de los vertidos urbanos e industriales, así como de los fertilizantes y plaguicidas empleados en la agricultura, entre otros.

El nitrógeno total (N total) es la suma de las concentraciones del nitrógeno orgánico e inorgánico. Este parámetro es un indicador de la contaminación por aguas residuales y fertilizantes (Septory y Triyatmo 2016).

- **Fósforo**

El fósforo puede llegar a los sistemas acuáticos de una fuente natural como la producción y descomposición de la materia orgánica, la erosión de las rocas y el lavado de suelos, o por actividad antrópica como la descarga de desechos industriales y aguas

cloacales. Los detergentes y fertilizantes contribuyen al contenido de fósforo en los cuerpos de agua. En cuerpos de agua naturales, el fósforo se encuentra principalmente como fósforo inorgánico en forma de fosfato soluble, o como fósforo orgánico (Winkler, 1995). El fósforo presenta una tendencia a la acumulación en sedimentos. Su movilidad en los sistemas acuáticos se ve limitada a las relaciones tróficas y a los equilibrios químicos entre los compartimentos sedimento-agua. El fósforo total (P total) es la suma de las especies de fósforo inorgánico y orgánico. Las elevadas concentraciones de P total, al igual que de N total, está asociada con procesos de eutrofización de las aguas, con el consecuente desarrollo de cianobacterias y algas que pueden cambiar la dinámica de los sistemas acuáticos (Teichberg *et al.*, 2010).

1.1.2. Calidad del agua

La calidad del agua está relacionada directamente con la composición y con los usos a los que se destina el recurso hídrico. De esta manera, se ha definido como contaminado a un sistema acuático cuando se ve alterada su composición y no es apto para uno o todos los usos a los que está destinado (Orozco *et al.*, 2003). Para los diferentes usos de los sistemas acuáticos (consumo humano, preservación de la vida acuática, bebida de especies de producción animal, irrigación de cultivos, actividades recreativas, entre otros) se han establecido rangos permitidos y valores guía para diferentes parámetros fisicoquímicos. En nuestro país, pueden nombrarse los valores guía establecidos por la Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC) y la Secretaría de Gestión Ambiental (SGA), por la Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (SRHN), por el Instituto Nacional del Agua (INA) y especialmente por la Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina, entre otros. En el Anexo 2 se describen los valores guía adoptados por los diferentes organismos para la protección de la vida acuática.

La eliminación extensiva de la vegetación ribereña, la irrigación, el drenaje, la aplicación de plaguicidas son factores que alteran los flujos y la calidad del agua. La expansión e intensificación de la agricultura en Argentina durante las últimas décadas ha tenido como consecuencia la degradación de las características del paisaje y del agua (Volante *et al.*, 2015). En este contexto, es relevante desarrollar monitoreos ambientales que permitan evaluar la calidad del agua en los sistemas acuáticos impactados por la actividad antrópica.

1.1.2.1. Eutrofización

El excesivo aporte de nitrógeno, fósforo y cloruro en los cuerpos de agua, proveniente de fuentes contaminantes puntuales y difusas, provoca un enriquecimiento de nutrientes que afecta la biota acuática (O’Farrell *et al.*, 2002). Como consecuencia del aporte excesivo de nutrientes, se produce un desequilibrio entre los procesos biológicos de síntesis y de degradación de la materia orgánica, afectando principalmente a la biomasa algal y bacteriana (Smith y Schindler 2009), originándose un proceso de eutrofización (Ansari *et al.*, 2010).

Un inapropiado uso, manejo y aprovechamiento de los cuerpos de aguas determinan que los procesos de eutrofización se incrementen con un crecimiento excesivo de algas, disminución de oxígeno disuelto, cambio de pH, ocasionando una alteración de los ecosistemas y perdida de la biodiversidad acuática (Quirós *et al.*, 2002; Hilton *et al.*, 2006; Cosme *et al.*, 2015).

1.1.2.2. Metales

Los metales pesados pueden ser parte de los contaminantes presentes en los cuerpos de agua, los cuales se pueden originar de forma natural a partir de la corteza terrestre y las emisiones volcánicas, o por actividades antrópicas. Durante las últimas décadas, la descarga de metales en los cuerpos de agua se ha incrementado considerablemente (Reyes *et al.*, 2016). Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que poseen un peso atómico y una densidad alta. Pueden ocasionar un gran impacto en los sistemas acuáticos ya que, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no son biodegradables y por lo tanto persisten en el ambiente. Algunos metales pesados constituyen micronutrientes esenciales para los organismos, sin embargo, a elevadas concentraciones resultan tóxicos. Otros metales no esenciales son tóxicos a muy bajas concentraciones (Alarcón-Corredor, 2009). Por lo tanto, es importante realizar estudios que permitan identificar la concentración de estos metales en los cuerpos de agua. En el Anexo 2, se describen valores guía para la protección de la vida acuática para diferentes metales pesados.

1.1.2.3. Plaguicidas

Los países han adoptado la utilización de plaguicidas para aumentar la producción de los cultivos a partir de la eliminación de plagas generando una gran cantidad de residuos

tóxicos que son liberados al ambiente (FAO y IWMI, 2017). Todas las actividades humanas desarrolladas en las márgenes de los cuerpos de agua generan desechos que llegan al compartimento acuático por procesos de escorrentía y lixiviación (FAO y IWMI, 2017; Raju, 2006), los cuales se incrementan por las lluvias y las inundaciones (Talabi y Kayode, 2019).

Después de una aplicación, parte de los plaguicidas con lo que se fumigan los cultivos pueden llegar a los sistemas acuáticos superficiales y subterráneos, afectando la calidad del agua y los ecosistemas. La escorrentía superficial, el drenaje superficial y la deriva durante las fumigaciones representan las rutas principales por las cuales estos compuestos alcanzan los cuerpos de agua y se convierten en contaminantes (Schäfer *et al.*, 2011), y pueden ocasionar efectos adversos sobre diferentes organismos acuáticos que allí habitan.

Particularmente en Argentina, la región pampeana representa el 80% de la tierra cultivable de todo el país (González *et al.*, 2010). El río Reconquista, ubicado en la llanura pampeana, recibe efluentes que contienen diversos contaminantes a lo largo de su recorrido. Aproximadamente 72.000 hectáreas, en el tramo superior de la cuenca, son utilizadas para actividades agropecuarias que pueden afectar negativamente los cursos de agua debido a la introducción de plaguicidas (Rovedatti *et al.*, 2001).

Basado en este panorama es primordial desarrollar estudios relacionados con el uso de plaguicidas y sus efectos en los sistemas acuáticos. A su vez, considerando que en Argentina la evaluación de la calidad del agua es insuficiente para conocer en profundidad el estado sanitario de los ambientes acuáticos, resulta relevante realizar monitoreos ambientales basados en las características propias de los cuerpos de agua y determinar las sustancias y especies químicas presentes.

1.2. Hipótesis

- El agua superficial en los arroyos de la subcuenca Las Catonas, Cuartel V, Partido de Moreno, tiene una composición fisicoquímica influenciada por la interacción de procesos climáticos, geológicos y los aportes de las actividades antrópicas que allí se desarrollan.
- La calidad del agua superficial de los arroyos de la subcuenca Las Catonas, Cuartel V, Partido de Moreno, se ve afectada por la actividad antropogénica desarrollada en los alrededores.

1.3. Objetivos específicos:

- Realizar la caracterización hidroquímica del agua superficial de la subcuenca Las Catonas, Cuartel V, Partido de Moreno.
- Evaluar de forma sistemática las diferencias en las características fisicoquímicas entre los sitios de muestreo, así como la variación estacional de las mismas.
- Determinar la presencia de metales en el agua superficial de la subcuenca Las Catonas, Cuartel V, Partido de Moreno.
- Determinar y cuantificar los niveles de plaguicidas en el agua superficial de la subcuenca Las Catonas, Cuartel V, Partido de Moreno.

1.4. Materiales y métodos

1.4.1. Sitio de Estudio

Para el diseño de los muestreos se consideró el monitoreo estacional durante dos años de tres sitios en una región del río Reconquista, en la localidad Cuartel V del Partido Moreno, Provincia de Buenos Aires. En la cuenca media de este río se encuentra la subcuenca Las Catonas (Figura 5) que presenta distintos tipos de impactos antropogénicos: residencial, agrícola e industrial. Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto institucional del IQUIBICEN “*Análisis de estrategias de biorremediación de ambientes contaminados con xenobióticos en el conurbano bonaerense mediante estudios genéticos, metabólicos, fisiológicos, ecotoxicológicos, estructurales y de biología sintética*” (PUE 22920160100064CO).

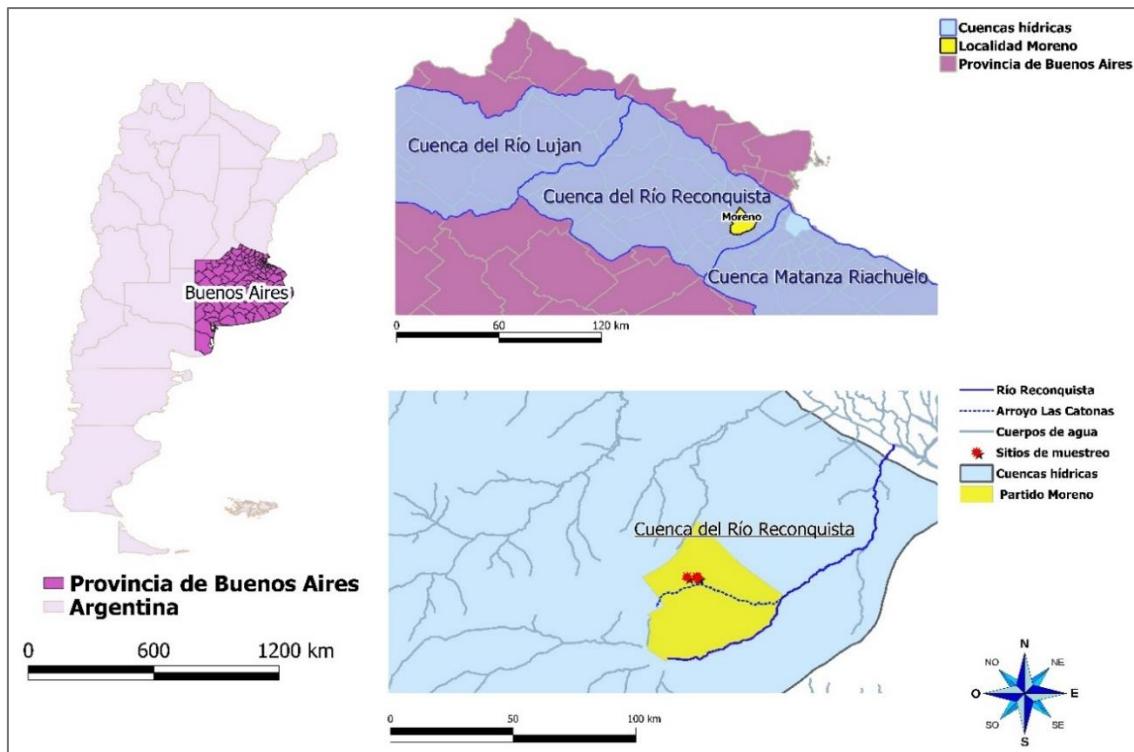


Figura 5. Cuencas Hídricas de la Región Metropolitana de Buenos Aires. Río Reconquista y subcuenca Las Catonas. Mapa elaborado con el programa QGIS 3.

Los sitios de muestreo elegidos fueron tres: Sitio A ($34^{\circ}34'52.2"S$ $58^{\circ}50'07.8"O$, tributario aguas arriba, cercano a zona residencial), Sitio B ($34^{\circ}34'51.5"S$ $58^{\circ}49'26.3"O$, frente a una planta de tratamiento y en el inicio a una zona de huertas) y Sitio C ($34^{\circ}34'56.1"S$ $58^{\circ}49'20.6"O$, aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo)

(Figura 6).



Figura 6. Mapa con sitios de muestreo en el río Reconquista. **Sitio A:** tributario aguas arriba, cercano a zona residencial, **Sitio B:** frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas, **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo. La línea azul marca el curso del río.

Se realizaron 8 campañas de muestreo de agua durante las diferentes estaciones del año (invierno, primavera, verano, otoño), durante dos años consecutivos (invierno 2017 – otoño 2019).

A fin de evaluar el efecto del clima en la composición del agua y en el caudal, se registraron los valores de precipitación y de temperatura durante los 30 días previos al muestreo. Esos valores fueron tomados de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) para las coordenadas de muestreo. (<https://www.ready.noaa.gov/hypub-bin/trajtype.pl>)

1.4.2. Determinación de parámetros fisicoquímicos *in situ* y en laboratorio.

En todos los muestreos se midió *in situ* la temperatura, el pH y la conductividad del agua con un sensor Hanna, modelo HI 9811-5; y el oxígeno disuelto (OD) con un oxímetro Hanna, modelo HI 9146. En todos los casos los electrodos fueron calibrados utilizando soluciones estándares de pH 4,00 y pH 7,00 para el electrodo de pH, solución estándar de KCl 0,01 M ($1413 \mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$) para el electrodo de conductividad, y el electrodo de oxígeno se calibró al aire.

El valor de sólidos disueltos totales (TDS) fue calculado a partir de la conductividad mediante la relación

$$TDS = 0,64 * CE$$

donde CE es la conductividad eléctrica expresada en $\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$.

Además, se estimó el caudal (Q) teniendo en cuenta el ancho total del cauce (a), la profundidad (h) y la velocidad (v). Esta última fue determinada midiendo el tiempo que un cuerpo flotante se desplazaba por un tramo de distancia conocida del arroyo. El caudal (Q) se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Q = a \times h \times v \quad [1.2]$$

Para la determinación de la mayoría de los parámetros fisicoquímicos, las muestras fueron recolectadas y conservadas en botellas de polipropileno, sin dejar cámara de aire. Las muestras para determinar metales fueron colectadas en recipientes de plástico lavados previamente con ácido nítrico 1:1 y realizando entre 12 y 15 enjuagues con agua mili-Q. Para la determinación de plaguicidas, las muestras fueron almacenadas en envases de polipropileno y de vidrio color caramelo. En cada sitio se recolectaron dos muestras determinándose los diferentes parámetros fisicoquímicos por duplicado.

Todas las muestras se transportaron en heladera hasta el laboratorio para ser posteriormente analizadas. Una vez en el laboratorio, se utilizó un turbidímetro modelo Hach 2100P para la determinación de turbidez. Las muestras tomadas para las determinaciones fisicoquímicas (nitratos, nitritos, amonio, alcalinidad, fósforo inorgánico, dureza, cloruro, sulfato) fueron filtradas con una bomba de vacío, una vez que alcanzaron la temperatura ambiente, utilizando membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,45 micrones. Una vez filtradas, se mantuvieron en heladera en frascos de plástico mientras duró el análisis.

A partir de las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio determinadas se calculó el nitrógeno inorgánico total (NiT) como la suma de las concentraciones parciales de cada una de las especies inorgánicas del nitrógeno, expresadas como ^{14}N . En forma equivalente se calculó el fósforo inorgánico total (PiT), expresado como ^{31}P .

Para la determinación de metales las muestras se acidificaron con ácido nítrico de alta pureza libre de metales a pH <2 una vez que alcanzaron la temperatura ambiente, y se

filtraron bajo las mismas especificaciones previamente mencionadas, posteriormente las muestras fueron conservadas a -20°C, hasta su determinación.

Las muestras correspondientes a la medición de plaguicidas fueron conservadas sin tratamiento previo, a -20°C hasta su determinación.

1.4.2.1. Metodologías analíticas

Las determinaciones fisicoquímicas fueron realizadas por técnicas analíticas colorimétricas (nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, DQO), titulométricas (alcalinidad y dureza), cromatográficas (cloruros, sulfatos, sodio, potasio, magnesio y calcio). En la Tabla 2 describen los parámetros fisicoquímicos determinados, las unidades en que fueron expresados los resultados y la metodología o sensor utilizados (ver descripción detallada en el Anexo 3).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de agua, unidades, metodología y/o equipamiento utilizado.

Parámetro	Unidades	Metodología
Temperatura	°C	Sensor Hanna HI 9811-5
pH		Sensor Hanna HI 9811-5
Oxígeno Disuelto	mg O ₂ × L ⁻¹	Sensor Hanna HI 9146
Conductividad	µS × cm ⁻¹	Sensor Hanna HI 9811-5
Dureza	mg CaCO ₃ × L ⁻¹	Titulador digital con EDTA 0,800 M
Alcalinidad	mg CaCO ₃ × L ⁻¹	Titulador digital con H ₂ SO ₄ 1,6 M
Nitrito	mg NO ₂ × L ⁻¹	Método de diazotización 8507 HACH ^a
Nitrato	mg NO ₃ × L ⁻¹	Método de reducción de cadmio 8039 HACH ^a
Amonio	mg NH ₄ × L ⁻¹	Método salicilato 8155 HACH ^a
Fósforo inorgánico	mg PO ₄ ³⁻ × L ⁻¹	Método 8048 HACH ^a
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg O ₂ × L ⁻¹	Método estándar colorimétrico 5220 D
Turbidez	NTU	Turbidímetro Hach 2100P
Cloruros	mg Cl ⁻ × L ⁻¹	Determinación por cromatografía iónica
Sulfatos	mg SO ₄ ²⁻ × L ⁻¹	Determinación por cromatografía iónica
Sodio	mg Na ⁺ × L ⁻¹	Determinación por cromatografía iónica
Potasio	mg K ⁺ × L ⁻¹	Determinación por cromatografía iónica
Magnesio	mg Mg ²⁺ × L ⁻¹	Determinación por cromatografía iónica
Calcio	mg Ca ²⁺ × L ⁻¹	Determinación por cromatografía iónica

^a Para determinar la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro HACH UV-Visible Modelo DR/2010.

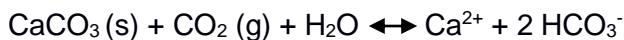
1.4.3. Análisis de diagramas hidroquímicos

Se relacionaron los datos de la composición iónica en los sitios de muestreo, a partir de diagramas de dispersión que permiten visualizar e interpretar alguno de los procesos determinantes en el agua superficial del sitio de estudio. Para estos análisis se utilizaron todos los resultados obtenidos para cada sitio en los distintos muestreos.

1.4.3.1. Diagrama de calcita a diferentes presiones parciales de CO₂

La composición de las aguas de los sistemas líticos se caracteriza por el equilibrio de carga y la saturación de la calcita en equilibrio con la atmósfera (Lombardo *et al.*, 2010). Se representó la concentración de HCO₃⁻ respecto de la concentración de Ca²⁺ en un

gráfico doble logarítmico, obteniéndose una línea de pendiente 0,5 que corresponden a las siguientes ecuaciones:



Y por balance de carga

$$2 [\text{Ca}^{2+}] = [\text{HCO}_3^-]$$

En la misma figura se superpusieron las curvas de saturación de calcita a diferentes presiones parciales de CO₂ (pCO₂, líneas rectas de pendiente negativa). Así se obtuvo en el diagrama dos zonas claramente diferenciadas, donde la zona por debajo de la curva de pCO₂ menor a 10^{-3,5} atm corresponde a ríos con aguas subsaturadas en calcita, mientras que la zona comprendida entre 10^{-3,5} atm < pCO₂ < 10^{-2,0} atm corresponde a la zona de dominio de aguas saturadas a presiones parciales de CO₂ mayores a la atmosférica. Esto se debe a que esas aguas, en general, tienen alto contenido de CO₂ producto de los procesos de respiración de los organismos y/o al ingreso de aguas subterráneas caracterizadas por alta pCO₂.

1.4.3.2. Diagrama de Piper Hill Langelier

Este diagrama está formado por dos triángulos equiláteros donde se representan la composición catiónica (Na⁺ + K⁺; Ca²⁺; Mg²⁺) y aniónica (HCO₃⁻ + CO₃²⁻; SO₄²⁻; Cl⁻) del agua, respectivamente, y un rombo central donde se evalúa y se hace la intersección de la información de ambos triángulos. Según la zona en la que se encuentre el punto dentro del rombo se determina el tipo de agua presente en el sistema acuático. En la Figura 7 se muestra un ejemplo del Diagrama de Piper.

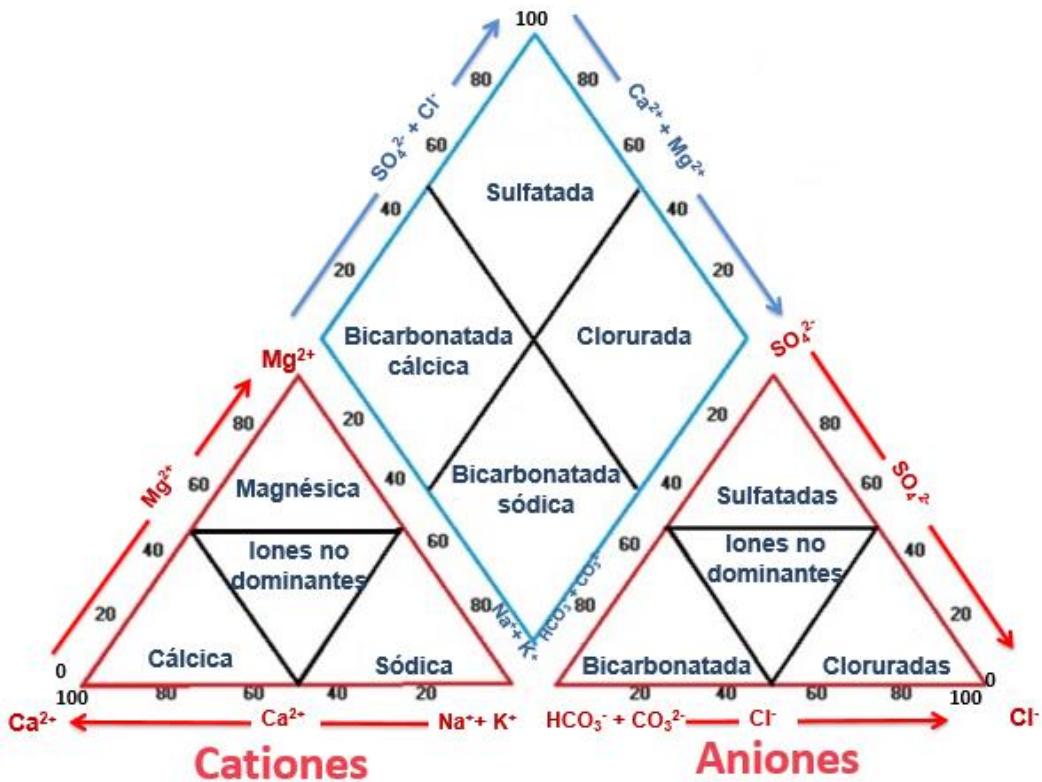


Figura 7. Modelo del diagrama de Piper.

Para su construcción, se expresaron todas las concentraciones de los iones en meq x L⁻¹, y éstas fueron transformadas a porcentaje dentro del diagrama. Cada uno de los vértices en los triángulos corresponde al 100% de un catión o anión. Este diagrama permite evidenciar las variaciones en el intercambio iónico que están ocurriendo dentro del cuerpo de agua, generadas por las mezclas, precipitaciones y disoluciones, es decir, visualizar la evolución hidrogeoquímica del agua y a partir de estas variaciones determinar el tipo de agua presente en el sistema.

1.4.3.3. Diagrama de Stiff

El diagrama de Stiff cuenta con tres líneas paralelas igualmente espaciadas y una línea recta en el centro que representa el cero, quedando definidas dos secciones: la concentración de aniones (hacia la derecha) y la de cationes (hacia la izquierda). Se une cada punto de cada concentración generando un polígono, que permite visualizar de forma gráfica la variación de las relaciones entre cationes y aniones para cada uno de los sitios de muestreo. La concentración de los iones fue expresada en meq x L⁻¹ y se promediaron los valores obtenidos para cada parámetro durante las 8 campañas para cada sitio de muestreo. En la Figura 8 se muestra un modelo de este diagrama.

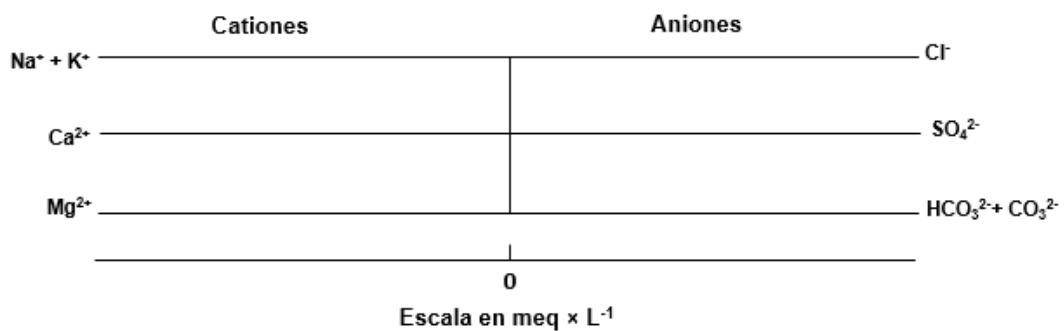


Figura 8. Modelo del diagrama de Stiff.

El diagrama de Stiff se utilizó de manera comparativa entre los sitios de muestreo, es decir, teniendo en cuenta el grafico obtenido en el Sito A, se comparó con los obtenidos para los Sitios B y C, y de esta manera se determinó la tendencia en los cambios de la composición química.

1.4.3.4. Diagrama de Gibbs

Este diagrama fue propuesto por Gibbs (1970) y modificado por Wetzel (1982). En el mismo se grafica la concentración de los sólidos disueltos totales (TDS) y la relación de $\text{Na}^+ /(\text{Na}^++\text{K}^+)$, para cationes y $\text{Cl}^-/(\text{Cl}^-+\text{HCO}_3^-)$ para aniones. A partir de dichas relaciones se evidencia de forma gráfica (distribución tipo boomerang) los procesos geoquímicos que influyen en la composición química de los cuerpos de agua naturales. En la Figura 9 se muestra el modelo del diagrama catiónico de Gibbs (1970) modificado por Wetzel (1982), indicando los procesos predominantes.

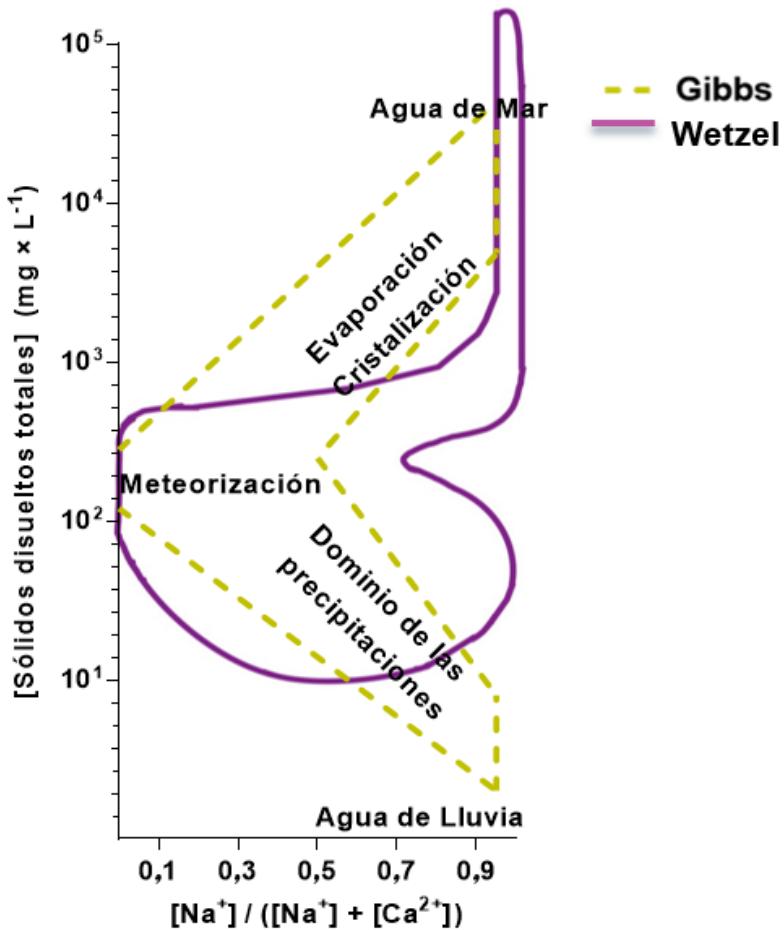


Figura 9. Modelo del diagrama catiónico de Gibbs (1970) modificado por Wetzel (1982).

La composición química del agua superficial de los sistemas léticos a nivel mundial se genera a partir de tres procesos:

Evaporación / cristalización: La composición del agua tiende a ser marina. Este proceso se ubica en la zona superior derecha del boomerang de Gibbs. Los valores de TDS y la relación $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$ son altos. En esta zona predominan los procesos de evaporación.

Meteorización: Es la zona central del grafico de Gibbs y predomina procesos de intemperismo donde existe una gran interacción entre el agua y la roca. Los valores de TDS son medios y ocupan aproximadamente la primera mitad del eje $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$.

Dominio de las precipitaciones: Corresponde a una zona donde las precipitaciones son altas. Este proceso se ubica en la zona inferior derecha del boomerang de Gibbs donde los valores de TDS son bajos y la relación $\text{Na}^+ / (\text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+})$ es alta.

Aunque estos procesos se explican por separado, es relevante mencionar que estos no son excluyentes entre sí.

1.4.3.5. Diagrama de Schoeller-Berkaloff.

En este diagrama, se representaron las concentraciones de todos los iones expresadas en $\text{meq} \times \text{L}^{-1}$ y se promediaron los valores obtenidos para cada parámetro durante todas las campañas para cada sitio de muestreo. Este diagrama permite evidenciar diferencias en la composición de los iones entre los sitios de muestreo.

1.4.4. Determinación de Metales

Los metales y niveles de arsénico fueron determinados por servicios a terceros del Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental de la Universidad de San Martín (3ia, UNSAM), mediante espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) con celda de colisión, modelo 7500cx, marca Agilent. Se utilizaron estándares internos para la corrección de señal por deriva instrumental. Se realizó una curva de calibración entre $0,1$ y $300 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$. El límite de cuantificación es de $0,1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para todos los metales determinados a excepción del Al, Fe y Ag para los que es $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

En relación con los niveles de metales cuantificados en los diferentes sitios de muestreo, se realizó un análisis cualitativo a partir de los gráficos de perfiles y se compararon los valores obtenidos con los niveles guía para la protección de la vida acuática establecidos por algunas entidades reguladoras.

1.4.5. Identificación y cuantificación de plaguicidas

Para la primera campaña (invierno 2017), las concentraciones analíticas de plaguicidas se determinaron en colaboración con un laboratorio de toxicología de Colombia donde se realizó un screening de 177 pesticidas en todas las muestras. Se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas del tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo (LC-QTOF). Se usó un equipo Agilent modelo 1260 Infinity con un detector Agilent QTOF 6530 equipado con ionizador dual ESI. Se empleó una columna Eclipse Plus C-18 con un tamaño de partícula de $1,8 \mu\text{m}$, con un diámetro $2,1 \text{ mm}$ y un largo de 100 mm . Los espectros de los picos obtenidos en los cromatogramas fueron comparados con los espectros de la librería de compuestos químicos incluida en el sistema de manejo de información (pesticidas PCL). Las curvas de calibración en el

rango de 0,5 a 19 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para cada pesticida fueron preparadas a partir de estándares certificados (Mix- Supelco). En la Tabla 3 se muestran los plaguicidas analizados y en la Figura 10 se muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas para el blanco, límite de detección y límite de cuantificación para clorpirifós.

Tabla 3. Plaguicidas analizados en la primera campaña (invierno 2017).

Plaguicidas						
Glifosato	Clordano	Tetraconazole	Mevinphos	carfentrazone-ethyl	Nicosulfuron	Fenobucarb
2,4D	imidacloprid	Propiconazole	Phosphamidon	Chloridazon	Novaluron	Fenpropidine
Clorpirifós	HBC	Tricyclazol	Picolinafen	Chlorsulfuron	Propargite	Fenpyroximate
Atrazina	Azamethiphos	Uniconazole-P	Pirimicarb	Clofentezine	Phenmedipham	imidacloprid
Trifluralin	Bezalaxy	Vamidothion	Pirimiphos-methyl	Cyazofamid	Triflumuron	Iprovalicarb
Deltametrina	Bifentrina	Acetronitrile	Procymidone	Cymoxanil	Phoxim	Methabenzthiazurone
Cialotrina (λ -cikalothrin)	Bromuconazol	Bitertanol	Profenos	DEET (Diethyltolumide)	Quinoclamine	Methomyl
Iprodiona	Buprimate	clethodim	Propyzamide	Diflubenzuron	Prometon	Methoxfenozide
Procimidona	Chlorfenviphos	Difenoconazole	Pendimethalin	Ethirimol	Tribenuron methyl	Oxamyl
Endosulfan	Chlopyrifos- methyl	Etofenprox	Quinalfos	Ethofumesate	Oxasulfuron	Picoxystrobin
Cipermetrina	Coumaphos	Fenhexamid	Quinoxifen	Famoxadon	Propaquizafop	Propamocarb
Flurocloridona	Diazinon	Indoxacarb	Propetamphos	Flazasulfuron	Prosulfocarb	Pyraclostrobin
metolaclor	Dichlorvos	Isoxaflutole	Tebufenpyrad	Flufenoxuron	Rimsulfuron	Pyridaben
Ampa	Diniconazole	Malaoxon	Tepraloxydime	Fuberidazole	Triasulfuron	Pyridat
Paraquat	Epoxiconazol	Mecarbam	Terbufos	Hexythiazox	Silthiofam	Pyriproxyfen
acetoclor	Ethion	Mepanipyrim	Tolclofos Methyl	Isocarbophos	Thifensulfuron Methyl	Tebufenozide
clorimuron	Fenarimol	Metalaxy	Tolyfluanid	Isoxaben	Teflubenzuron	Thiabendazole
metsulfuron	Fenbucanozole	Metazachlor	Triadimefon	Kresoxim.methyl	Acetamiprid	Thiacloprid
Imazetapir	Fludioxonil	Methidathion	Triazophos	Linuron	Alanycarb	Thiametoxam
Paration	Fluquinconazole	Metolaclor	Triflumizol	Lufenuron	Aldicarb	Thiodicarb
Malation	Flusilazole	Molinate	Phosalone	Manpropamid	Azoxystrobin	Thifanox
Diuron	Hexaconazole	Oxadiazon	Amidosulfuron	Metaflumizone	Carbendazim	
lindano	Imazalil	Oxadixyl	Aminocarb	Metamitron	Carboxin	
Aldrin	Ipconazole	Paclobutrazol	Benfuracarb	Metrafenone	Dimethomorph	
DDT	Metconazole	Penconazole	Boscalid	Metribuzin	Fenamidone	
Dieldrin	Ethoprop	Phenthroate	Butocarboxim	Monocrotohos	Fenazaquin	

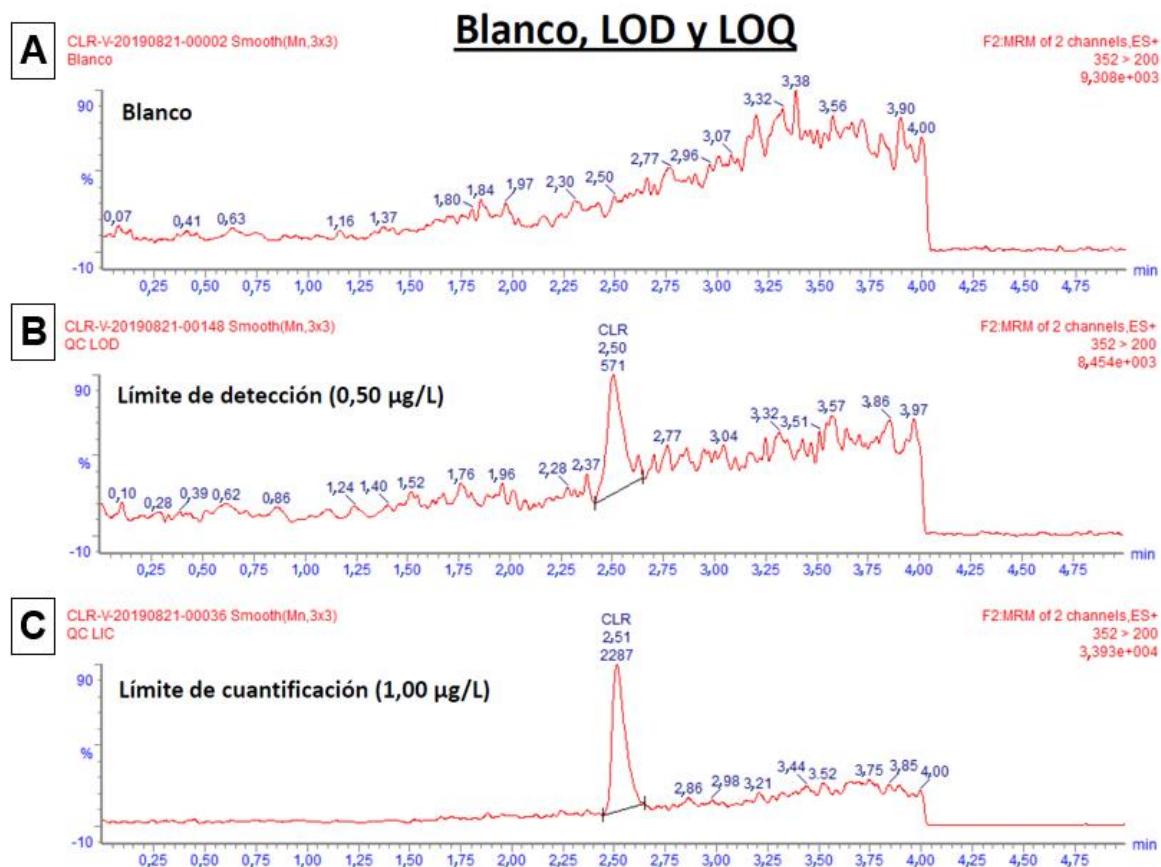


Figura 10. Cromatogramas correspondientes a la determinación de clorpirifós. **A.** Blanco, **B.** Límite de detección **C:** Límite de cuantificación

Debido a dificultades en la disponibilidad de equipamiento no fue posible realizar un *screening* durante los muestreos subsiguientes. A partir de la segunda campaña se cuantificó glifosato y clorpirifós en colaboración con el Hospital Italiano. El análisis se circunscribió a estos plaguicidas considerando que dentro de los organofosforados más utilizados en el país para combatir plagas agrícolas se encuentra el herbicida de amplio espectro, glifosato (N-(fosfonometil) glicina; $C_3H_8NO_5P$; PMG) y el insecticida clorpirifós (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato; $C_9H_{11}Cl_3NO_4P$; CPF) (CASAFE, 2014). Para la determinación de los mismos se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra-performance (UPLC) modelo Acquity H-class marca Waters, compuesto por una bomba cuaternaria (Quaternary Solvent Manager), un muestreador automático FTN (Flow-Through Needle) y un horno de columnas. El cromatógrafo estuvo acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo Xevo TQ S marca Waters.

Para la determinación de glifosato en agua las muestras fueron derivatizadas con cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna modelo Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm 1.8 μ m)

marca Waters. Las fases móviles fueron soluciones de acetato de amonio 5,0 mM en agua (fase móvil A) y en acetonitrilo agua (95:5) (fase móvil B). Se trabajó utilizando un método de gradiente y la duración de la corrida fue de 12 min. La fuente de iones (Electrospray Source Ionization (ESI)) se operó en modo positivo. La adquisición de datos se realizó mediante el monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Las curvas de calibración se realizaron en el rango de 0,5 a 100 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y se utilizó 1,2-¹³C, ¹⁵N-glifosato como estándar interno.

Debido a dificultades en la disponibilidad del equipamiento, no fue posible realizar un *screening* durante los muestreos subsiguientes. A partir de la segunda campaña, se cuantificaron los niveles del herbicida de amplio espectro glifosato (N-(fosfonometil) glicina; $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$; PMG) y del insecticida clorpirifós (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato; $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_4\text{P}$; CPF). El análisis se circunscribió a estos dos plaguicidas considerando que se encuentran dentro de los organofosforados más utilizados en el país para combatir plagas agrícolas (CASAFE, 2014). Las determinaciones se realizaron en colaboración con el Hospital Italiano. Se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra-performance (UPLC) modelo Acquity H-class marca Waters, compuesto por una bomba cuaternaria (Quaternary Solvent Manager), un muestreador automático FTN (Flow-Through Needle) y un horno de columnas. El cromatógrafo estuvo acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo Xevo TQ S marca Waters.

Para la determinación de glifosato en agua, las muestras fueron derivatizadas con cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna modelo Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm 1.8 μm) marca Waters. Las fases móviles fueron soluciones de acetato de amonio 5,0 mM en agua (fase móvil A) y en acetonitrilo:agua (95:5) (fase móvil B). Se trabajó utilizando un método de gradiente y la duración de la corrida fue de 12 min. La fuente de iones (Electrospray Source Ionization (ESI)) se operó en modo positivo. La adquisición de datos se realizó mediante el monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Las curvas de calibración se realizaron en el rango de 0,5 a 100 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y se utilizó 1,2-¹³C, ¹⁵N-glifosato como estándar interno.

Para la determinación de clorpirifós en agua, las muestras se diluyeron con acetonitrilo y fase móvil A (especificada más adelante), previo a su inyección en el equipo. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna modelo Acquity UPLC BEH C8 (2,1 x 50 mm 1.7 μm) marca Waters. Las fases móviles fueron soluciones de ácido

fórmico al 0,005% en agua (fase móvil A) y en acetonitrilo (fase móvil B). Se trabajó utilizando un método de gradiente y la duración de la corrida fue de 10 min. La fuente de iones (Electrospray Source Ionization (ESI)) se operó en modo positivo. La adquisición de datos se realizó mediante el monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Las curvas de calibración se realizaron en el rango de 1,0 a 100 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y se utilizó ácido 2-fenoxibenzoico como estándar interno.

1.4.6. Análisis estadístico.

Para la comparación entre sitios de muestreo por estación se aplicó la prueba ANOVA unifactorial; realizando el estudio de normalidad y de la homocedasticidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y el test de Levene. Para la evaluación de las comparaciones múltiples de la media se utilizó el post test de Tukey. Para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad y homocedasticidad se aplicó la prueba Kruskal Wallis y el post test Dunns. Se utilizó el programa estadístico OriginPro software 9.0.

Luego con el fin de analizar y evidenciar las interacciones entre todas las características fisicoquímicas determinadas durante las campañas en los diferentes sitios de muestreo, se realizaron análisis multivariados de componentes principales (PCA) y de clúster. Este tipo de tratamiento estadístico ha sido muy utilizado por varios autores para la clasificación de muestras de agua (Wunderlin *et al.*, 2001; Renau, 2010; Raiber *et al.*, 2012; Tripathi y Singal, 2019).

El análisis de clúster, la distribución de las variables, las matrices de correlación y los gráficos de PCA se realizaron en el programa estadístico Rgui package versión 3.6.3.

Se realizó un ANOVA de dos factores para analizar el estado de eutrofización del cuerpo de agua y de esta manera evaluar las diferencias existentes entre las estaciones y los diferentes sitios de muestreo.

El nivel de significancia para todos los casos fue $p<0,05$.

1.4.6.1. Correlación estadística y análisis multivariado de parámetros.

1.4.6.1.1. Análisis de componentes principales (PCA)

Se utilizó un análisis multivariado para evidenciar algunas relaciones existentes entre la composición fisicoquímica y los sitios de muestreo. Para ello, se realizó un PCA en el que se analizaron las características fisicoquímicas temperatura, OD, DQO, conductividad, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , P-PO_4^{3-} , pH, dureza, alcalinidad y turbidez. Este análisis permite condensar la información existente en una serie de variables originales en un número más pequeño de dimensiones complejas, las cuales son denominadas componentes o factores, con una mínima pérdida de la información original. Este análisis se realiza a partir de una matriz de correlación.

Para la selección de los componentes principales se utilizó el valor de eigen el cual debe ser mayor que uno (Kim *et al.*, 1987). Para la selección de las variables de cada componente se siguieron los criterios propuestos por Liu *et al.* (2003). De esta manera se asociaron aquellas variables que estuvieran correlacionadas al componente de acuerdo con la clasificación de coeficientes de correlación: muy fuerte ($>0,75$), moderado (0,75-0,50) y débil (0,50-0,30). Para este estudio se tomó como débil valores de correlación entre 0,50-0,40, según lo determinado por el programa estadístico utilizado (Rgui package).

1.4.6.1.2. Análisis clúster

Para evaluar la variación estacional de los parámetros fisicoquímicos entre los sitios de muestreo, se realizó un análisis no jerárquico de clúster o conglomerados (análisis de conglomerados de las K medias). Este análisis permite evidenciar de forma gráfica los resultados similares, ya que estos forman conglomerados que evidencian un alto grado de homogeneidad interna (dentro del conglomerado) y una heterogeneidad externa (entre los conglomerados). Es decir, los grupos que representan alguna equivalencia estarán conglomerados (regiones de alta densidad de puntos) y los grupos diferentes estarán alejados.

Al igual que para el PCA, se realizó un análisis de conglomerados para las diferentes variables fisicoquímicas seleccionadas, medidas en los sitios de muestreo durante las campañas. Este análisis divide el conjunto de datos en grupos en función de la distancia respecto a determinadas similaridades. Para este estudio se utilizó un análisis clúster

que clasifica los resultados dentro de un grupo relacionado jerárquicamente a partir de un dendograma, utilizando la distancia euclídea como medida de similitud y ligamiento completo como criterios de agrupación.

1.5. Resultados

Todos los valores de los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de iones determinados durante todas las campañas realizadas durante los dos años en los tres sitios de la subcuenca Las Catonas (cuenca del Río Reconquista, Cuartel V, Partido de Moreno, Provincia de Buenos Aires) se muestran en el Anexo 4.

1.5.1. Caracterización hidroquímica

En la Figura 11 se grafican las diferentes concentraciones de Ca^{2+} y HCO_3^- a diferentes presiones parciales de CO_2 en equilibrio con la calcita.

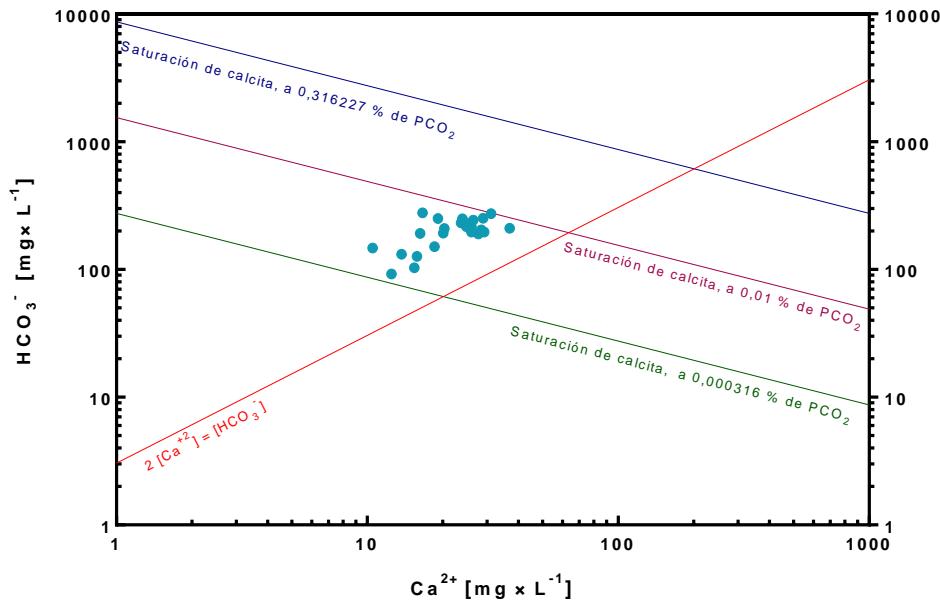


Figura 11. Concentraciones de Ca^{2+} y HCO_3^- a diferentes presiones parciales de CO_2 (g) (entre 10^{-2} y $10^{-3.5}$ atm).

Las relaciones de las concentraciones de Ca^{2+} y HCO_3^- en las muestras de agua indican que el sistema se encuentra sobresaturado en este último y en CO_2 (g) (presiones parciales entre 10^{-2} y $10^{-3.5}$ atm) en equilibrio con calcita. En la Figura 12 se muestran los diagramas de Piper obtenidos para cada sitio de muestreo a partir de los resultados obtenidos para las diferentes campañas.

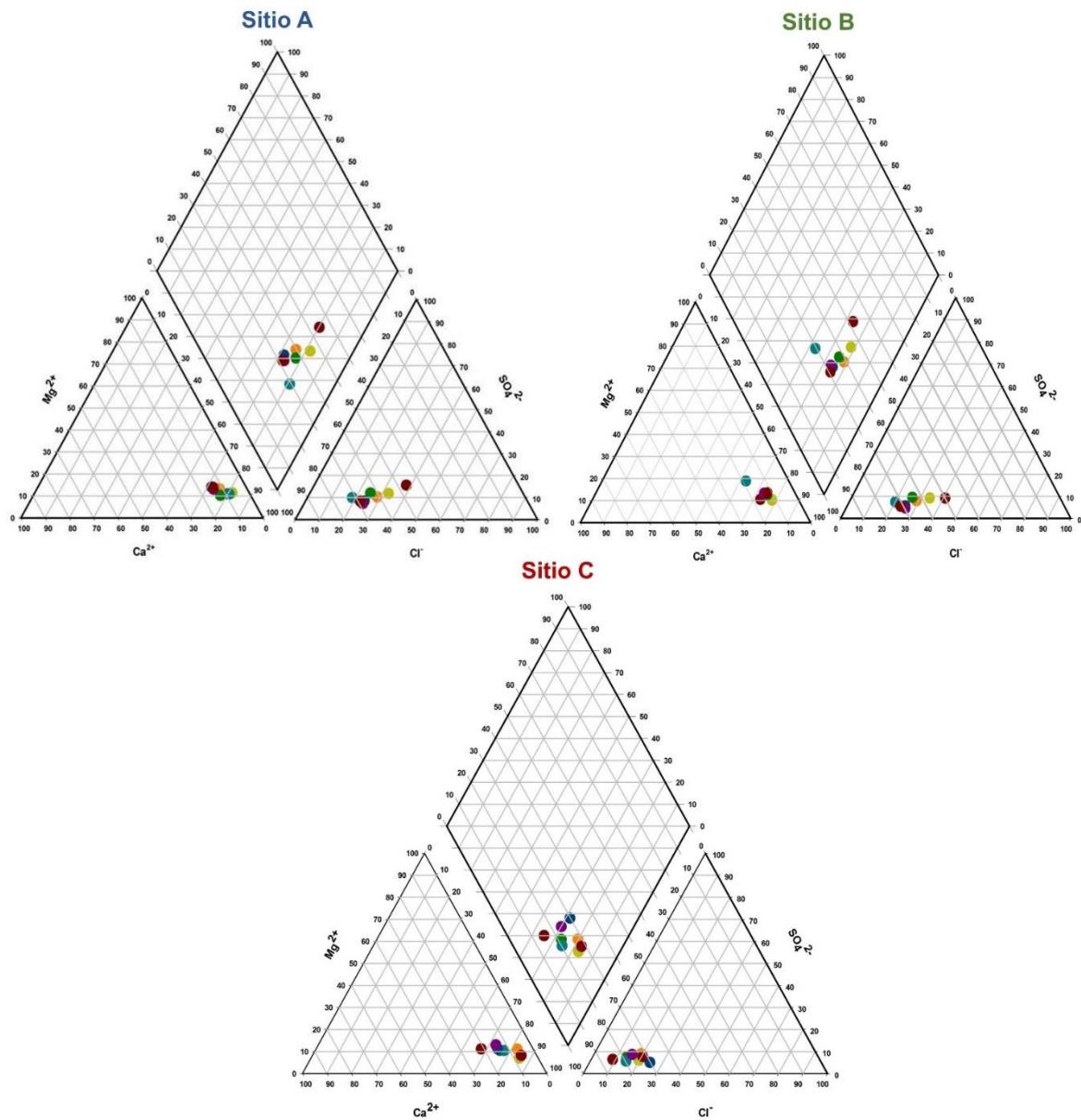


Figura 12. Diagramas de Piper para los sitios muestreo. **Sitio A:** tributario aguas arriba cercano a zona residencial, **Sitio B:** frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas. **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo.

A partir de los diagramas de Piper en los que se grafican los cationes y aniones, se determinó que el tipo de agua dominante en los sitios de muestreo es bicarbonatada sódica.

En la Figura 13 se muestran los diagramas de Stiff obtenidos para cada sitio de muestreo.

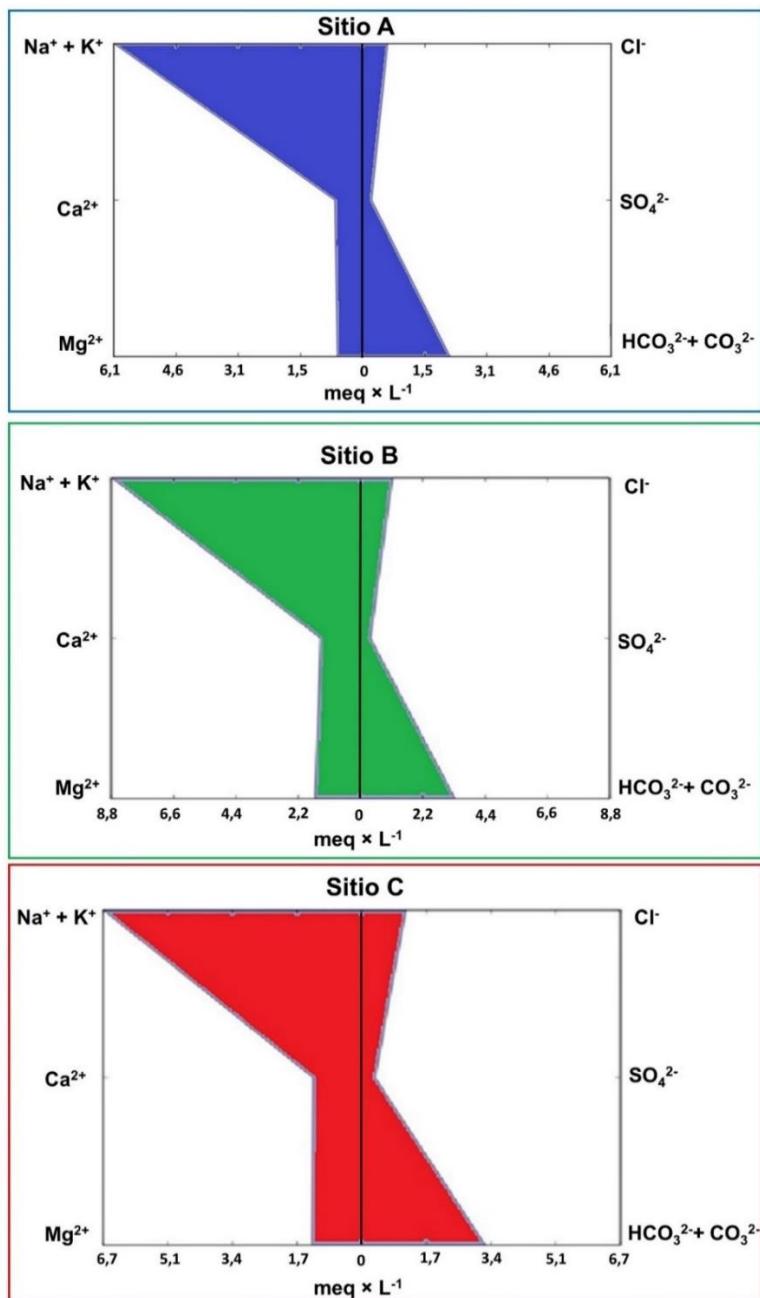


Figura 13. Diagrama de Stiff a partir de las concentraciones en $\text{meq} \times \text{L}^{-1}$ de cationes y aniones mayoritarios determinadas durante todas las estaciones para cada sitio de muestreo. **Sitio A:** tributario aguas arriba cercano a zona residencial **Sitio B:** frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas. **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo.

Las concentraciones medias más altas de los iones analizados en el diagrama de Stiff corresponden al Sitio B ($70 \text{ mg K}^+ \times \text{L}^{-1}$, $220 \text{ mg Ca}^{2+} \times \text{L}^{-1}$, $126 \text{ Mg}^{2+} \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, $1822 \text{ mg HCO}_3^- \times \text{L}^{-1}$); y al Sitio C ($1421 \text{ mg Na}^+ \times \text{L}^{-1}$, $240 \text{ mg SO}_4^{2-} \times \text{L}^{-1}$, $511 \text{ mg Cl}^- \times \text{L}^{-1}$), mientras que la concentración media de CO_3^{2-} resultó mayor en el Sitio A ($9 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$).

En la composición catiónica de los tres sitios de muestreo predominó el Na^+ más el K^+ y en la composición aniónica predominó el HCO_3^- más los CO_3^{2-} . Por otra parte, el Sitio A,

cercano a una zona residencial, es el que presentó menor concentración de HCO_3^- y CO_3^{2-} , a diferencia de los Sitios B y C donde se observaron mayores niveles de dichos iones. Las variaciones, diferencias y similitudes obtenidas entre los cationes y los aniones en los diferentes sitios de muestreo se observan con mayor claridad en el diagrama de Schoeller-Berkaloff (Figura 14).

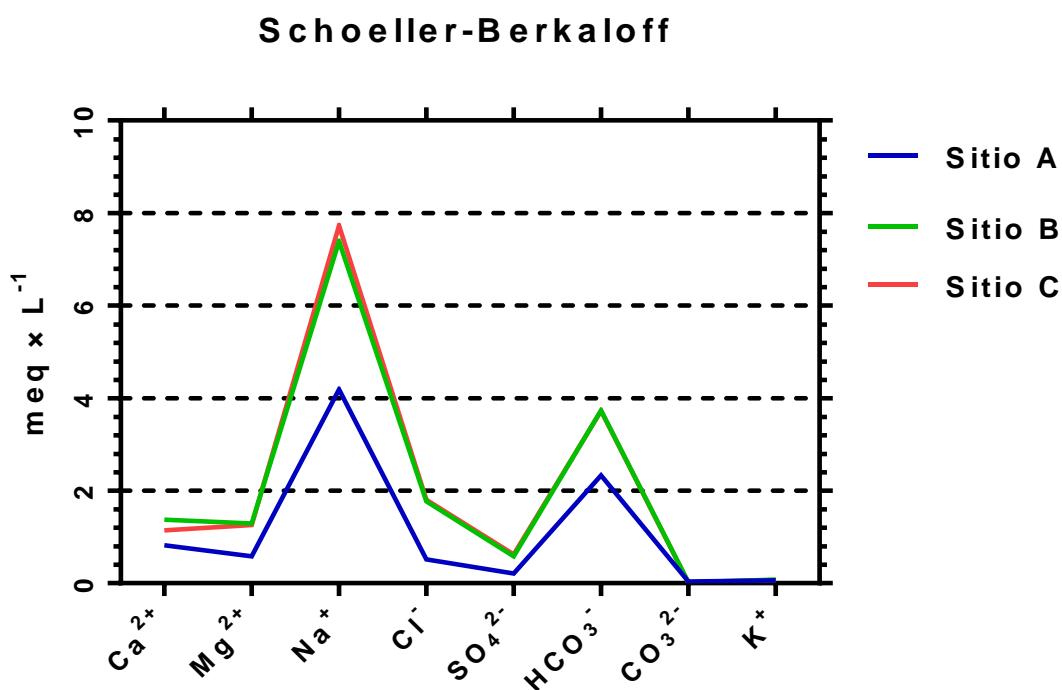


Figura 14. Diagramas de Schoeller-Berkaloff para los tres sitios de muestreo **Sitio A**: tributario aguas arriba cercano a zona residencial, **Sitio B**: frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas. **Sitio C**: aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo.

El diagrama de Schoeller-Berkaloff evidenció que las concentraciones de todos los iones mayoritarios del Sitio A, a excepción de carbonatos, son menores con respecto al Sitio B y Sitio C. Además, se observa para todos los sitios de muestreo una mayor concentración de sodio con respecto al resto de los iones.

El diagrama de Gibbs con modificación de Wetzel se muestra en la Figura 15.

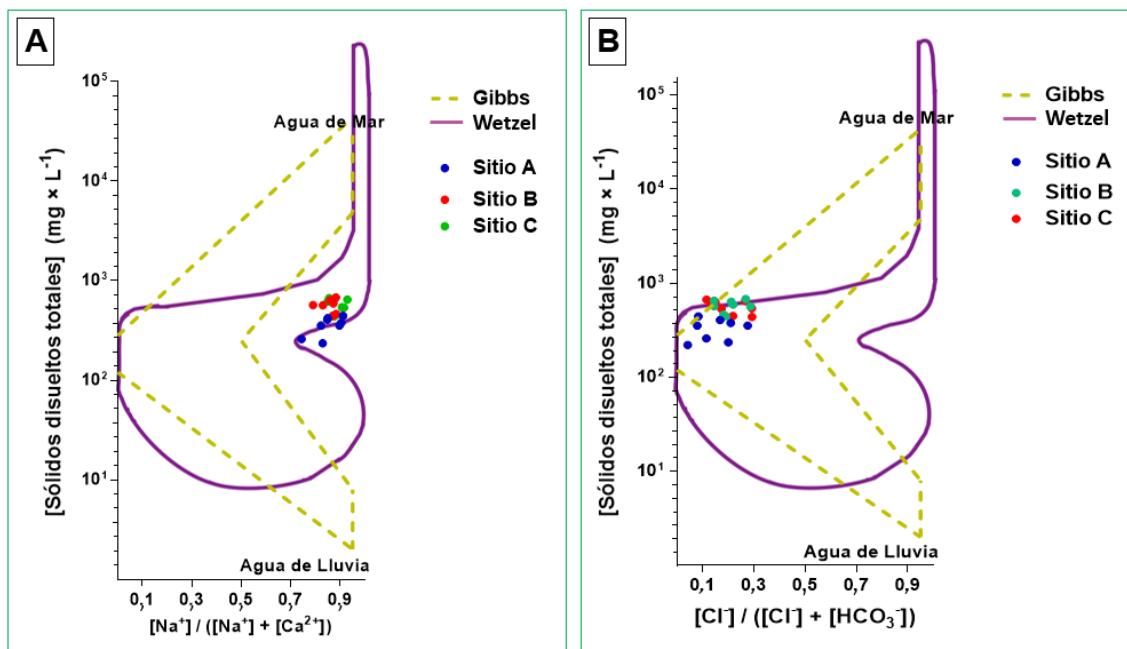


Figura 15. Diagramas de Gibbs para los tres sitios de muestreo. **Sitio A:** tributario aguas arriba cercano a zona residencial, **Sitio B:** frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas. **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo. **A)** Diagrama catiónico, **B)** Diagrama aniónico.

Al graficar la concentración de los TDS en función de los cationes ($[\text{Na}^+] / ([\text{Na}^+] + [\text{Ca}^{2+}])$) se observa que los datos obtenidos al establecer esta relación están por fuera del boomerang propuesto por Gibbs (Figura 15A). Al hacer el gráfico en función de los aniones ($[\text{Cl}^-] / ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$), los datos se encuentran dentro del boomerang, en la zona donde predomina el mecanismo de meteorización.

1.5.2. Parámetros climáticos y variaciones del caudal en los sitios de muestreo

Para evaluar la influencia del clima en la composición del agua, durante los 30 días previos al muestreo se registraron los valores de temperatura media y de precipitación informados por la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) para las coordenadas de muestreo (Tabla 4, Figura 16).

Tabla 4. Valores de temperatura media y de precipitación reportados durante 30 días previos a cada muestreo.

	Inviero 2017	Primavera 2017	Verano 2018	Otoño 2018	Inviero 2018	Primavera 2018	Verano 2019	Otoño 2019
T (°C)	11,9 ± 0,1	19,5 ± 0,2	21,7 ± 0,2	11,5 ± 0,1	10,2 ± 0,1	19,6 ± 0,13	23,1 ± 0,2	13,6 ± 0,1
P (mm)	129,6	62,4	56,4	118,5	76,1	166,9	107,7	69,2

T: Temperatura y P: Precipitación. Valores informados por la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) para las coordenadas de muestreo. (<https://www.ready.noaa.gov/index.php>)

De acuerdo con los valores de temperatura media registrados durante las campañas, se observan dos períodos: un período frío con un rango de temperatura entre 10,2°C y 13,6 °C, que corresponde a las estaciones de invierno y otoño; y un período cálido con un rango de temperatura entre 19,6°C y 23,1°C en las estaciones de primavera y verano.

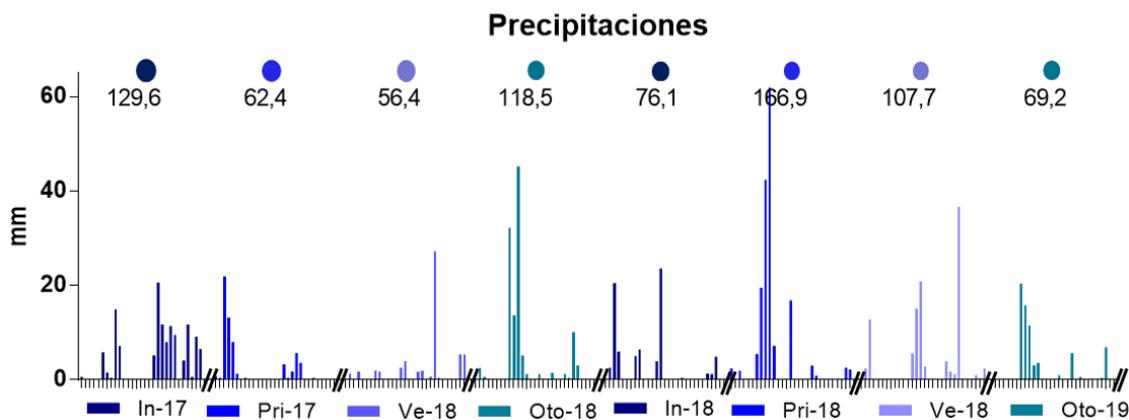


Figura 16. Precipitación. Los círculos indican los días de muestreo y la precipitación registrada durante los 30 días previos. Valores informados por la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) para las coordenadas de muestreo (<https://www.ready.noaa.gov/index.php>).

Las estaciones donde se registraron mayores precipitaciones fueron en invierno 2017 y primavera 2018 con valores de 129,6 y 166,9 mm, respectivamente; y las estaciones de menor precipitación correspondieron a verano 2018 y primavera 2017 con valores de 56,4 y 62,4 mm, respectivamente.

El caudal de los sitios de muestreo presentó variaciones espaciales y estacionales (Figura 17). Durante la estación más lluviosa (primavera 2018) se obtuvieron los valores más altos de caudal en los tres sitios de muestreo. Durante las dos últimas campañas, el caudal disminuyó en coincidencia con la disminución de las precipitaciones y las mayores temperaturas registradas. En las estaciones de primavera 2017 y otoño 2019, en las que se registraron bajas precipitaciones, se observó un menor caudal en los tres sitios de muestreo.

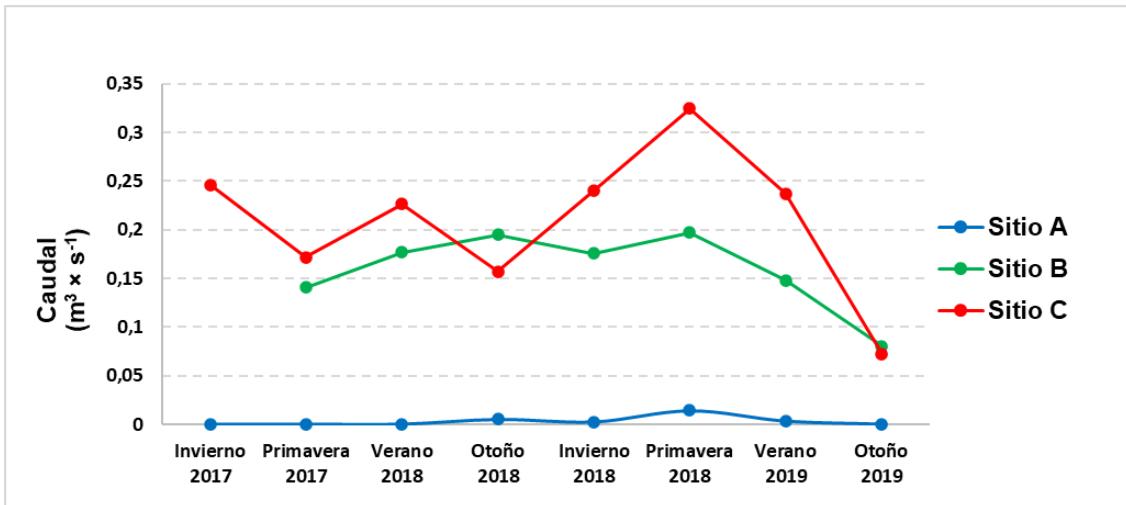


Figura 17. Caudal ($m^3 \times seg^{-1}$) determinado en los sitios de muestreo durante las diferentes campañas.

El caudal promedio del Sitio A fue notoriamente menor que el de los Sitios B y C; $0,003 m^3 \times seg^{-1}$ vs $0,139 m^3 \times seg^{-1}$ y $0,209 m^3 \times seg^{-1}$, respectivamente.

1.5.3. Características fisicoquímicas de los sitios de muestreo durante las diferentes estaciones del año.

En la Figura 18 se grafican los resultados obtenidos para todos los parámetros fisicoquímicos determinados a lo largo de los dos años de muestreo durante las diferentes estaciones del año.

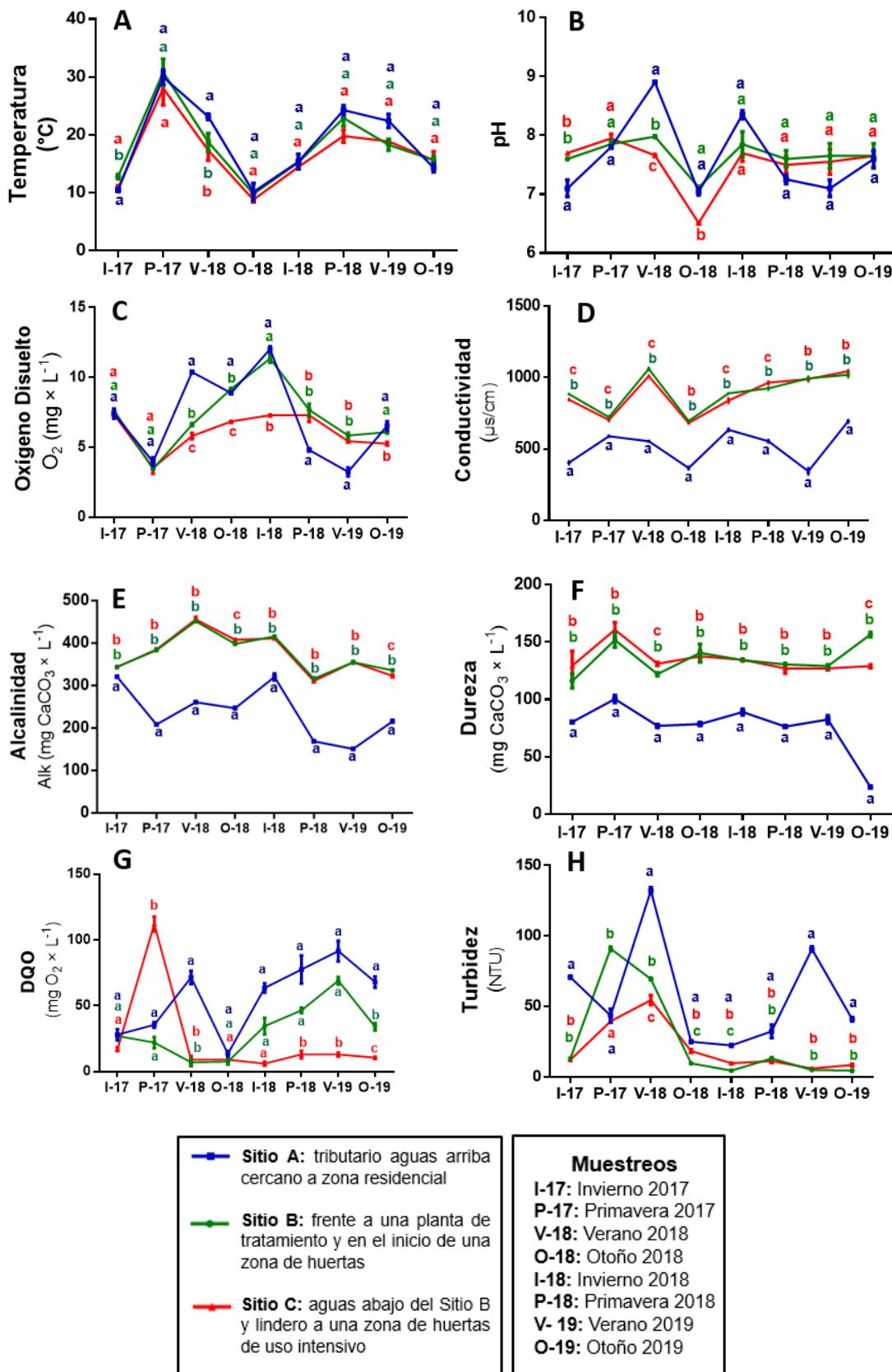
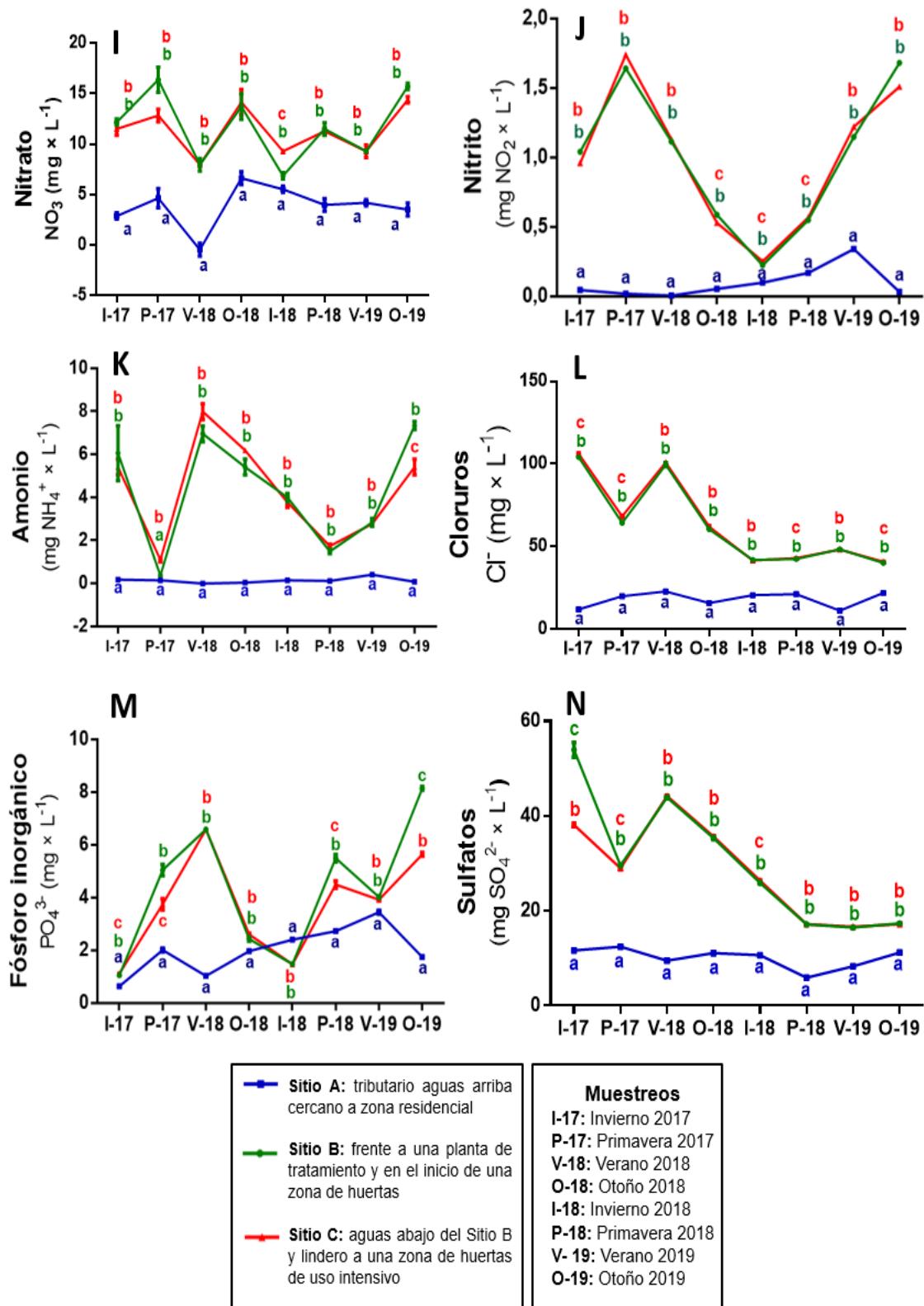


Figura 18. Parámetros fisicoquímicos determinados en los tres sitios de muestreo durante las diferentes estaciones climáticas a lo largo de dos años (invierno 2017 – otoño 2019): (A) Temperatura, (B) pH, (C) Oxígeno disuelto, (D) Conductividad, (E) Alcalinidad, (F) Dureza, (G) Demanda Química de Oxígeno, (H) Turbidez. Las letras representan diferencias significativas ($p<0,05$) entre los sitios de muestreo para cada campaña.



Continuación Figura 18. Parámetros fisicoquímicos determinados en los tres sitios de muestreo durante las diferentes estaciones climáticas a lo largo de dos años (invierno 2017 – otoño 2019): (I) Nitrato, (J) Nitrito, (K) Amonio, (L) Cloruros, (M) Fósforo inorgánico, (N) Sulfatos. Las letras representan diferencias significativas ($p<0,05$) entre los sitios de muestreo para cada campaña.

El rango de temperatura registrado durante los muestreos fue de 8,8 a 30,8°C, que corresponden a otoño 2018 y a primavera 2017, respectivamente (Figura 18A).

El pH varió entre 6,51, obtenido para el Sitio C en otoño 2018, y 8,88 que corresponde al Sitio A en verano 2018 (Figura 18B).

La alcalinidad se encontró en un rango de 151 a 456 mg × L⁻¹ (Figura 18E), registrados en el Sitio A en verano 2019 y en el Sitio C en verano 2018, respectivamente. La dureza presentó valores comprendidos entre 24 y 161 mg CaCO₃ × L⁻¹, presentando su valor mínimo en el Sitio A en otoño 2019 y su valor máximo en el Sitio C en primavera 2017 (Figura 18F).

Al graficar el OD en función de la temperatura y realizar una regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0,551. El valor de la pendiente de la recta obtenida fue de $-0,205 \pm 0,138$ ($\alpha = 0,05$) lo que confirmó un patrón de variación estacional en el que el OD disminuye al aumentar la temperatura. Los valores de OD fluctuaron entre 3,26 y 12,04 mg × L⁻¹ (Figura 18C). El valor más bajo (3,26 mg × L⁻¹) corresponde al Sitio A medido en verano 2019, mientras que el valor más alto (12,04 mg × L⁻¹) se obtuvo en el Sitio A en invierno 2018.

Los valores de conductividad oscilaron entre 345 $\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$ (Sitio A en verano 2019) y 1045 $\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$ (Sitio C en otoño 2019). Durante todas las campañas, los valores de conductividad del Sitio A fueron menores con respecto al Sitio B y C, que presentaron un perfil similar durante los dos años de muestreo (Figura 18D). Los valores medios de los sitios fueron de 519 $\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$, 900 $\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$ y 886 $\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$ correspondientes al Sitio A, B y C respectivamente.

Los análisis de PCA y de clústers permitieron integrar e interpretar de forma sistemática las diferencias observadas en los parámetros fisicoquímicos.

1.5.3.1. Análisis multivariado de los parámetros fisicoquímicos

1.5.3.1.1. Análisis de los parámetros fisicoquímicos mediante PCA

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los parámetros fisicoquímicos: temperatura, conductividad, OD, pH, alcalinidad, dureza, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, DQO, fósforo inorgánico y turbidez en los tres sitios de estudio durante las

diferentes campañas. Los coeficientes de correlación entre los componentes principales, las variables, el porcentaje de varianza y el valor de eigen para cada componente son representados en la Tabla 5.

Para la selección de los componentes principales se utilizó el valor de eigen mayor que uno. Se asociaron aquellas variables que estuvieran correlacionadas al componente de acuerdo con la clasificación de coeficientes de correlación: muy fuerte ($>0,75$), moderado (0,75 - 0,50) y débil (0,50 - 0,30). Para este estudio se tomó como débil valores de correlación entre 0,50 y 0,40, según lo determinado por el programa estadístico utilizado (Rgui package).

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre 12 parámetros de muestras de agua de la subcuenca Las Catonas en el río Reconquista de la provincia de Buenos Aires, localidad Cuartel V del Partido de Moreno.

Parámetro	PC1	PC2	PC3	PC4
Temperatura	<0,400	0,903*	<0,400	<0,400
Conductividad	0,824*	<0,400	<0,400	<0,400
OD	<0,400	-0,709*	0,587*	<0,400
pH	<0,400	<0,400	0,889*	<0,400
Alcalinidad	0,777*	<0,400	<0,400	<0,400
Dureza	0,856*	<0,400	<0,400	<0,400
Nitrito	0,790*	0,488*	<0,400	<0,400
Nitrato	0,855*	<0,400	<0,400	<0,400
Amonio	0,822*	<0,400	<0,400	<0,400
DQO	-0,553	0,521*	<0,400	-0,415
Fósforo inorgánico	0,627*	0,501*	<0,400	<0,400
Turbidez	-0,510	0,444*	<0,400	0,657
Valores eigen	5,064	2,565	1,494	0,803
% de varianza explicada	42,200	21,375	12,453	6,693
% de varianza acumulada	42,200	63,575	76,028	82,721

Los coeficientes en azul indican que el parámetro está fuertemente correlacionado ($>0,75$) o moderadamente correlacionados al componente. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p<0,05$) entre el parámetro y el componente (0,75-0,50).

Cuatro componentes explicaron el 82,72% de la variabilidad del conjunto de datos. Teniendo en cuenta el porcentaje de varianza, los valores de eigen y las correlaciones fuertes, se tomaron los tres primeros componentes para el análisis de correlaciones. En la Figura 19 se presenta la matriz de correlación obtenida para los tres componentes.

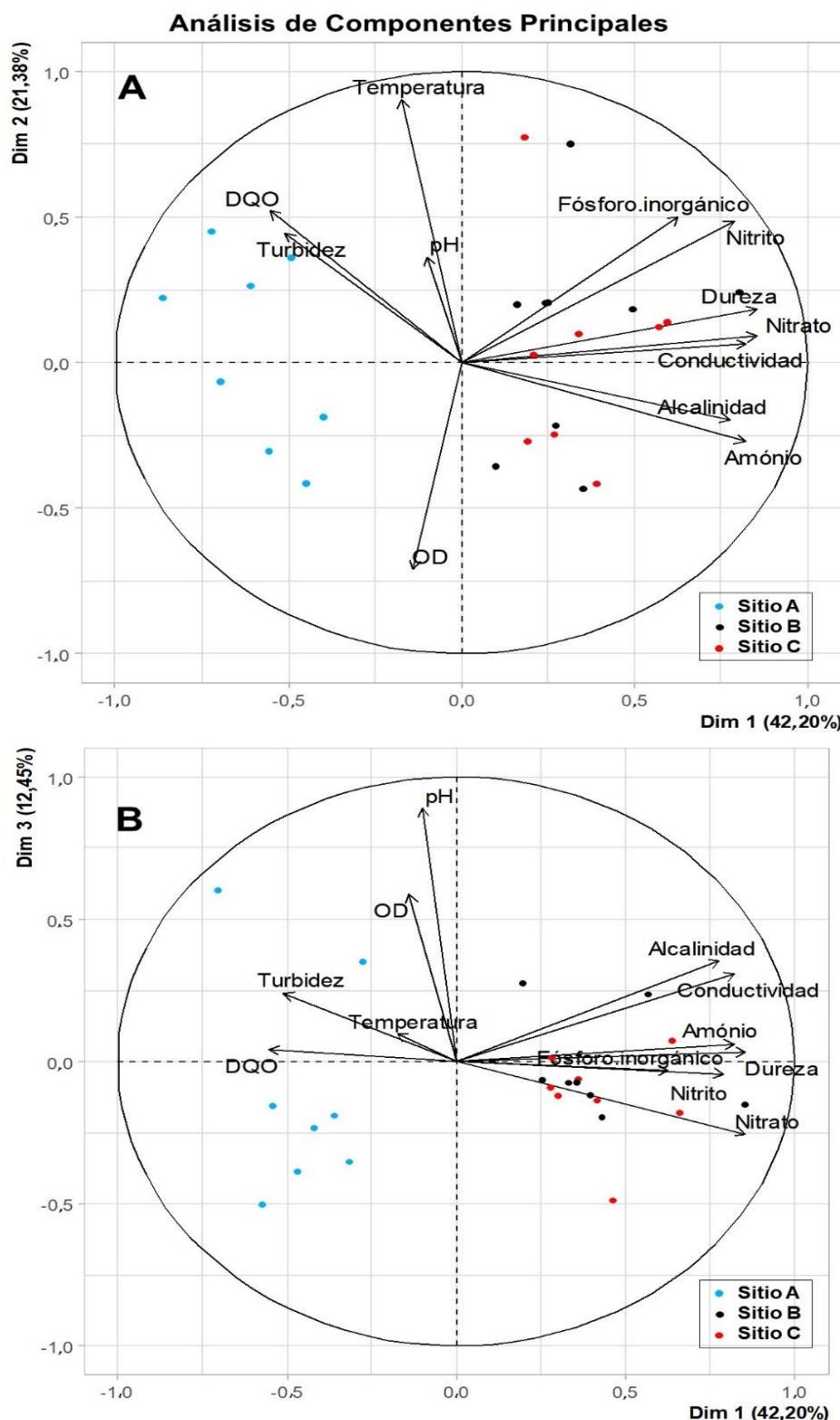


Figura 19. Análisis de componentes principales aplicado a los parámetros de las muestras de agua: Temperatura, conductividad, OD, pH, alcalinidad, dureza, nitrito, nitrato, amonio, DQO, fósforo inorgánico y turbidez. **Dim 1** (componente 1), **Dim 2** (componente 2), **Dim 3** (componente 3). **A:** componentes 1, 2 y **B:** componentes 1 y 3. Los puntos de colores corresponden a las muestras medidas en los diferentes sitios de muestreo: **azul:** Sitio A (tributario aguas arriba en la subcuenca Las Catonas, cercano a zona residencial); **negro:** Sitio B (enfrente a una planta de tratamiento y al inicio de la zona de huertas); **rojo:** Sitio C (aguas abajo, lindero a la zona de huertas de uso intensivo).

En el PCA se observa una diferencia en la agrupación de las mediciones del Sitio A con respecto a los Sitios B y C. Los valores obtenidos para estos dos últimos sitios coinciden con la zona de los vectores donde se registran las mayores concentraciones de muchos de los parámetros analizados.

El primer componente (CP1) representa el 42,20% de la varianza, donde se encontró una correlación positiva fuerte entre las variables dureza, nitratos, conductividad y amonio; y moderada con fósforo inorgánico. Además, se obtuvo una correlación negativa moderada con DQO y turbidez. Las diferencias resultaron significativas en todos los casos.

El segundo componente (CP2) representa el 21,38% de la varianza, y evidenció correlaciones significativas: positiva fuerte con temperatura; moderada con DQO y fósforo inorgánico; y débil con nitritos y turbidez; y una correlación negativa moderada con OD.

El tercer componente (CP3) representa el 12,45%, y se observó una correlación significativa positiva fuerte para pH, y moderada para OD.

1.5.3.1.2. Variación estacional de los parámetros fisicoquímicos en los sitios de muestreo (PCA, clúster)

En la Figura 20 se presenta la agrupación estacional y espacial obtenida en el PCA dendograma de los parámetros fisicoquímicos: temperatura, conductividad, OD, pH, alcalinidad, dureza, nitrito, nitrato, amonio, DQO, fósforo inorgánico y turbidez.

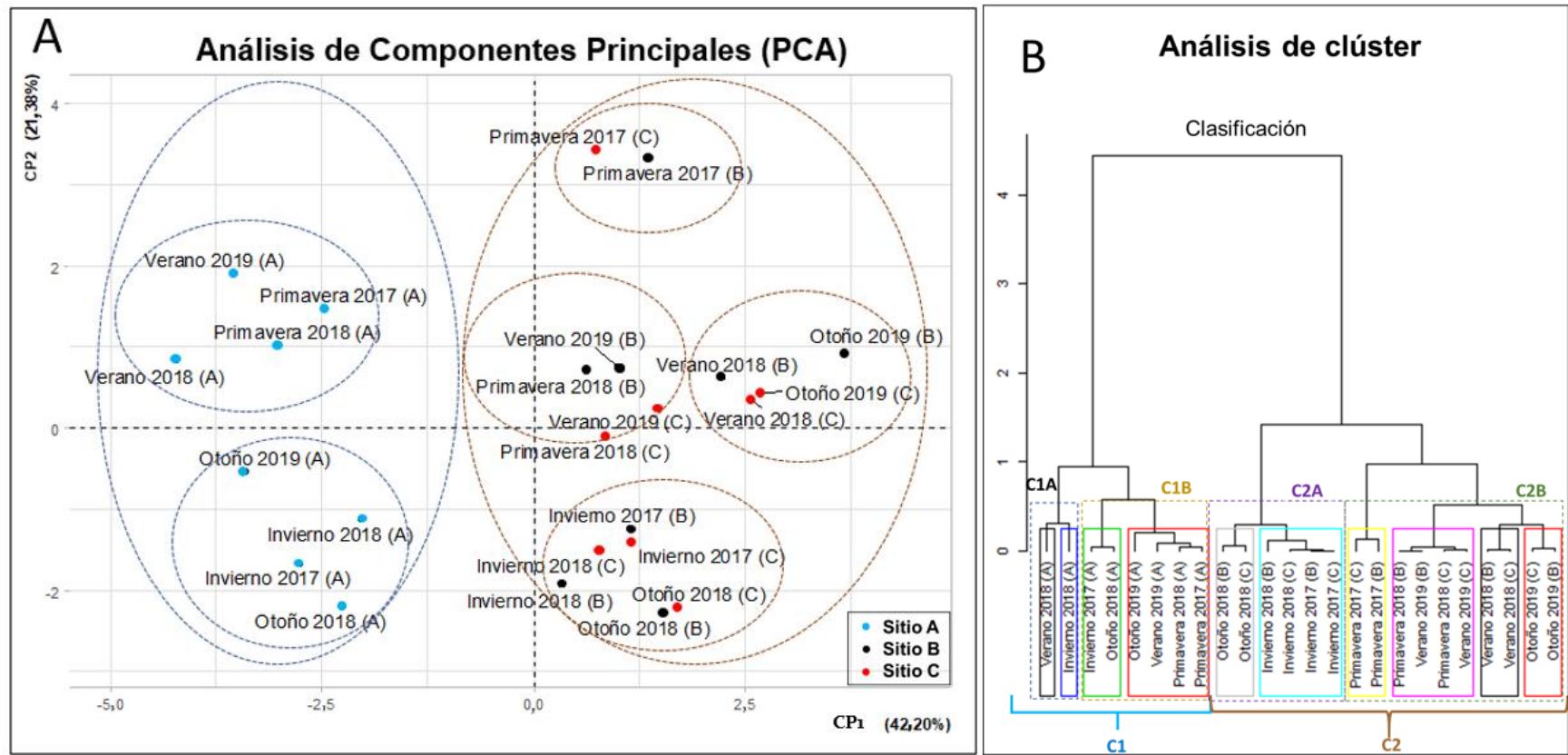


Figura 20. Tratamiento multivariado de los parámetros fisicoquímicos: Temperatura, conductividad, OD, pH, alcalinidad, dureza, nitrato, nitrato, amonio, DQO, fósforo inorgánico y turbidez. **A.** Representación gráfica de la agrupación del PCA. **B.** Dendograma obtenido a partir del análisis de clúster.

En la agrupación del PCA se identifican claramente las estaciones cálidas (verano y primavera) en la parte superior del gráfico, y las estaciones frías (invierno y otoño) en la parte inferior. En el dendograma, el clúster C1 agrupó las muestras correspondientes al Sitio A, pero a diferencia del PCA no se ve una relación clara entre las estaciones. El clúster C2 relaciona las muestras correspondientes al Sitio B y Sitio C. Este clúster está dividido en dos agrupaciones; la primera subdivisión denominada C2A reúne a las estaciones frías: invierno y otoño (a excepción de otoño 2019); y la segunda subdivisión denominada C2B agrupa las estaciones cálidas primavera y verano (aunque incluye a otoño 2019).

1.5.4. Análisis del estado de eutrofización del cuerpo de agua

Para estimar el estado trófico del cuerpo de agua se calcularon los valores medios de Nitrógeno inorgánico Total (NiT) y Fósforo inorgánico Total (PiT) en cada sitio de muestreo durante las diferentes estaciones climáticas. En la Figura 21 se muestran los valores obtenidos.

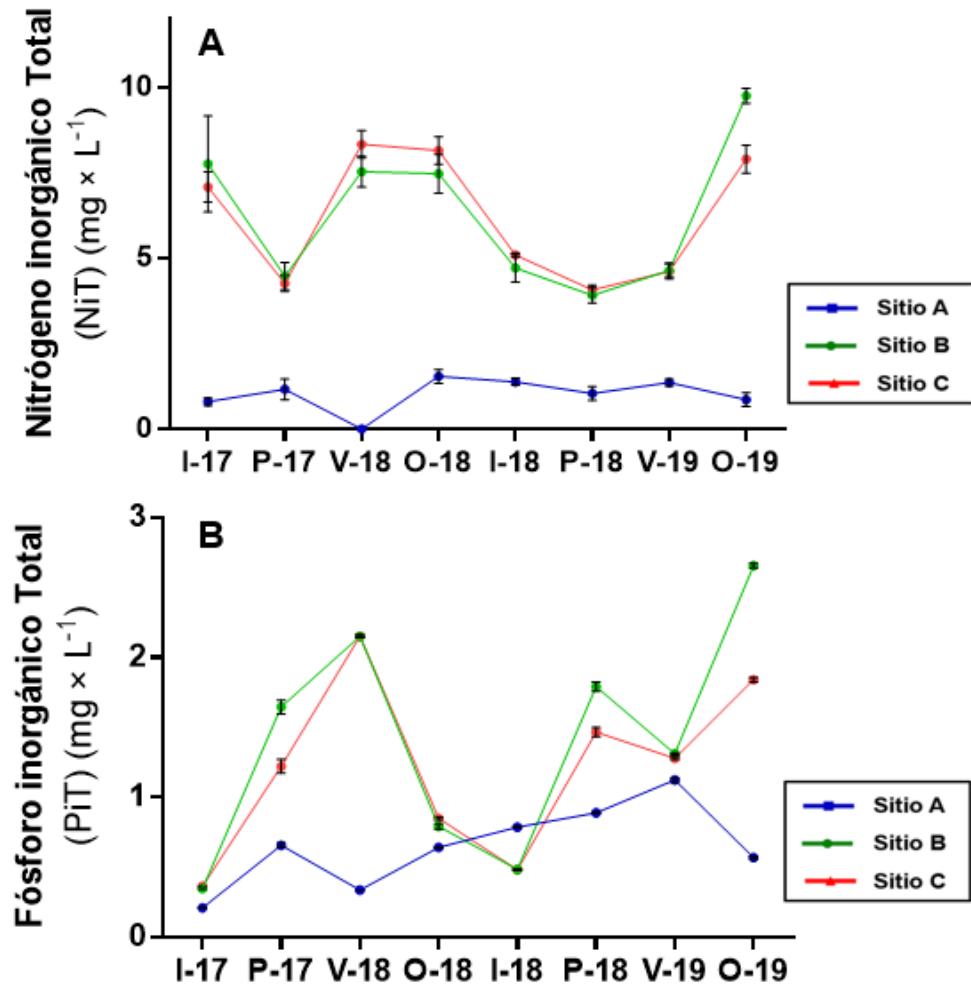


Figura 21. Nitrógeno inorgánico Total y Fósforo inorgánico Total. **Sitio A:** Valores medios de nitrógeno inorgánico total obtenido en cada sitio de muestreo durante las diferentes campañas. **B:** Valores medios de fósforo inorgánico total obtenido en cada sitio de muestreo durante las diferentes campañas. **Sitio A:** tributario aguas arriba en la subcuenca Las Catonas, cercano a zona residencial; **Sitio B:** enfrente a una planta de tratamiento y al inicio de una zona de huertas; **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo.

En los sitios B y C, se observaron las mayores concentraciones de NiT y PiT durante todas las estaciones, con excepción de PiT en invierno 2018 (Figura 21A y 21B). El ANOVA de dos factores para los niveles de NiT no determinó diferencias significativas para el factor tiempo, pero sí se observaron diferencias significativas para el Sitio A con respecto al Sitio B y C ($p<0,05$). El análisis estadístico para PiT evidenció diferencias significativas entre la estación de invierno 2017 y otoño 2019 ($p<0,05$) y entre los sitios de muestreo, donde el Sitio A presentó diferencias significativas con respecto al Sitio B y C ($p<0,05$).

1.5.5. Metales

En el Anexo 5 se muestran las concentraciones de metales registradas en los tres sitios de muestreo durante las campañas realizadas en las diferentes estaciones del año. En la Figura 22 se grafican los resultados obtenidos para los metales más relevantes.

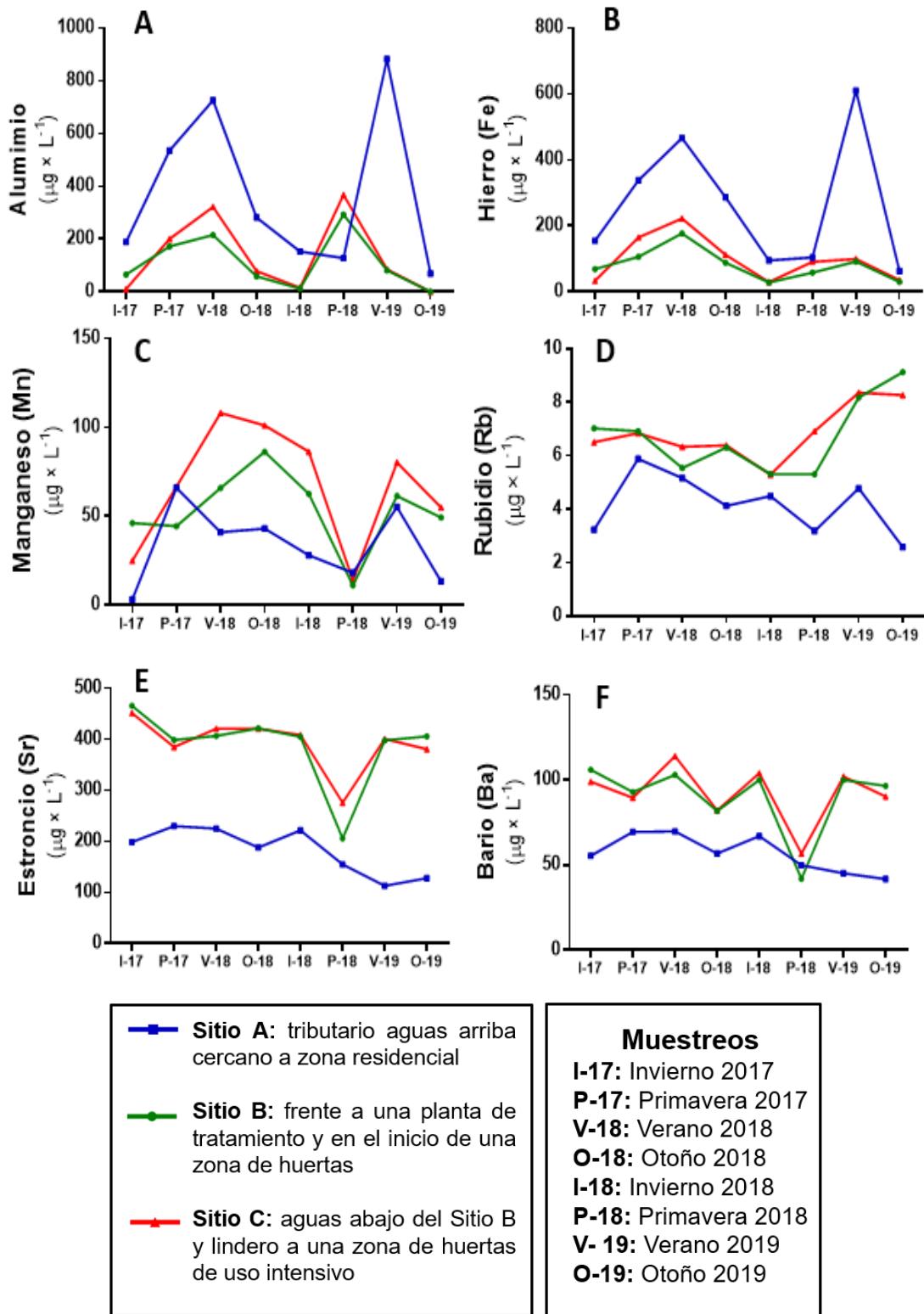
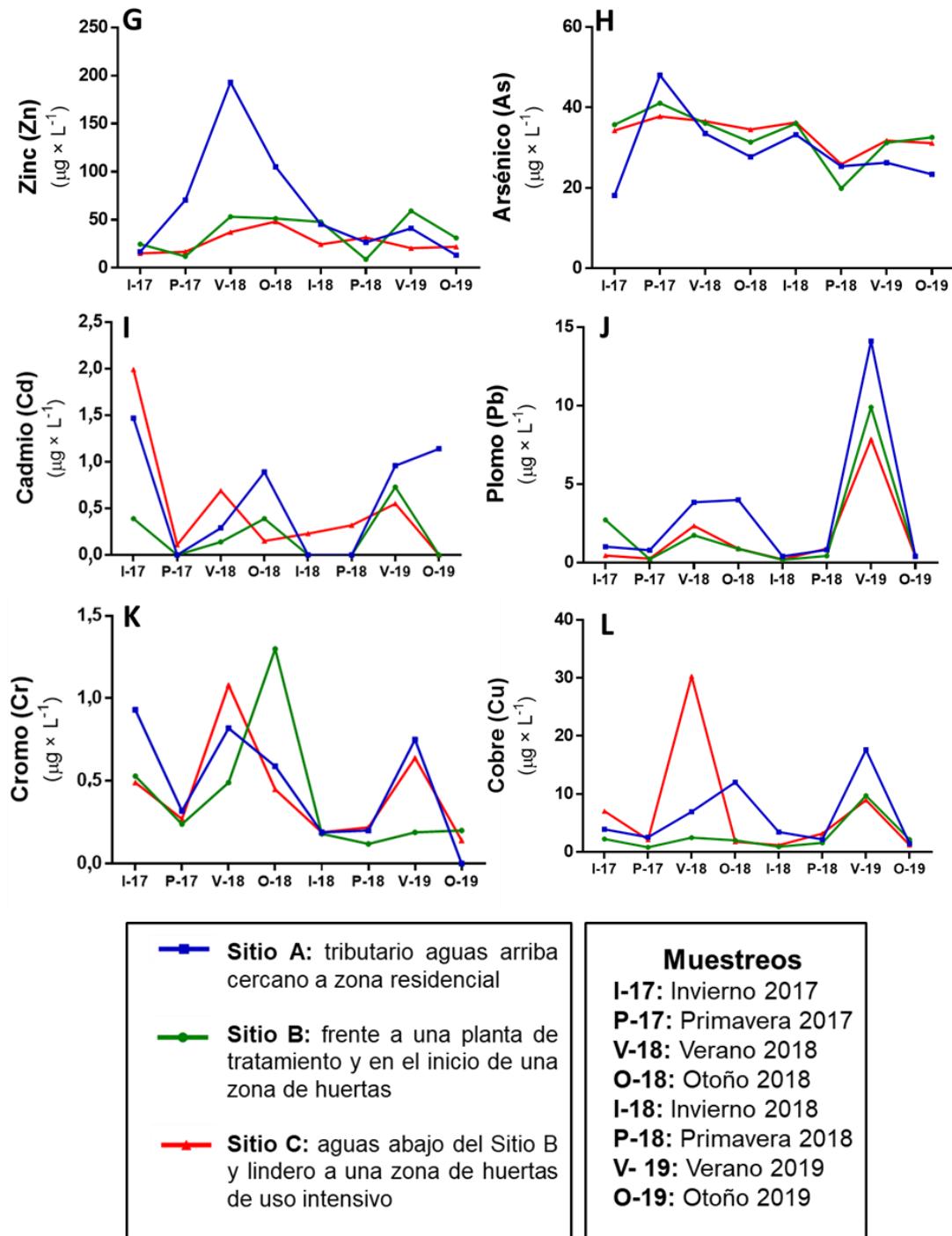


Figura 22. Concentración de algunos metales determinados en los tres sitios de muestreo durante las diferentes estaciones climáticas a lo largo de dos años (invierno 2017 – otoño 2019): (A) Aluminio, (B) Hierro, (C) Manganese, (D) Rubidio, (E) Estroncio, (F) Bario.



Continuación Figura 22. Concentración de algunos metales determinados en los tres sitios de muestreo durante las diferentes estaciones climáticas a lo largo de dos años (invierno 2017 – otoño 2019): **G**) Zinc, **H**) Arsénico, **(I)** Cadmio, **(J)** Plomo, **(K)** Cromo, **(L)** Cobre.

Las concentraciones de Li, V, Mn, Se, Rb, Sr, Ba fueron mayores en los Sitios B y C con respecto al Sitio A, con excepción de primavera 2018 donde los niveles de V, Mn y Ba de

los tres sitios de muestreo fueron similares. Los niveles de Li, V, Mn, Co, Ni, As, Sr, Ba disminuyeron en los tres sitios de muestreo durante la campaña primavera 2018, estación donde se registró la mayor precipitación y el caudal más elevado.

Para los metales As, Co, Ni, Zn, Cd, Pb y Cr, se observaron variaciones aleatorias de las concentraciones a lo largo de las diferentes campañas, no presentando tampoco diferencias notorias y constantes entre los sitios. En el 100 % de las muestras de los tres sitios de muestreo, las concentraciones de As, Ni, Cr y V no superaron los niveles guía para la protección de la vida acuática establecidos en el decreto 831/93 de la Ley de Residuos Peligrosos (LRPA, 1993). Tampoco se superaron los niveles guía de Li y Co establecidos por AIC y SGA (1996). Por otra parte, sí se superaron los niveles guía del decreto 831/93, en al menos algunas de las muestras, para Mn, Cu, Zn, Se, Cd y Pb. En el 75% de las muestras, las concentraciones superaron los niveles guía para Cu ($2 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, decreto 831/93 y SRHN (2005)) y en el 54 y 50 % de las muestras se encontraron por encima de los niveles guía para Cd ($0,2 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, decreto 831/93 y SRHN (2005) y $0,25 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, INA (2011)). Asimismo, entre el 29 y 38% de las muestras presentaron concentraciones de Pb por encima de los niveles establecidos ($1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, decreto 831/93 y SRHN (2005) y $2 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, INA (2011)). El 50 % de las muestras estuvieron por encima de los niveles guía para el Zn ($300 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$, AIC y SGA (1996), decreto 831/93 y SRHN (2005)).

1.5.6. Plaguicidas

Durante el primer muestreo (invierno 2017) se realizó un relevamiento de 177 plaguicidas especificados en materiales y métodos. Entre ellos se identificó DEET, paraquat y clorpirifós. Para los plaguicidas identificados, se procedió a su cuantificación mediante curvas de calibración con soluciones de referencia en el rango de $0,5$ a $19 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$. En la Figura 23 se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para algunas de las muestras de agua analizadas durante la campaña de invierno 2017.

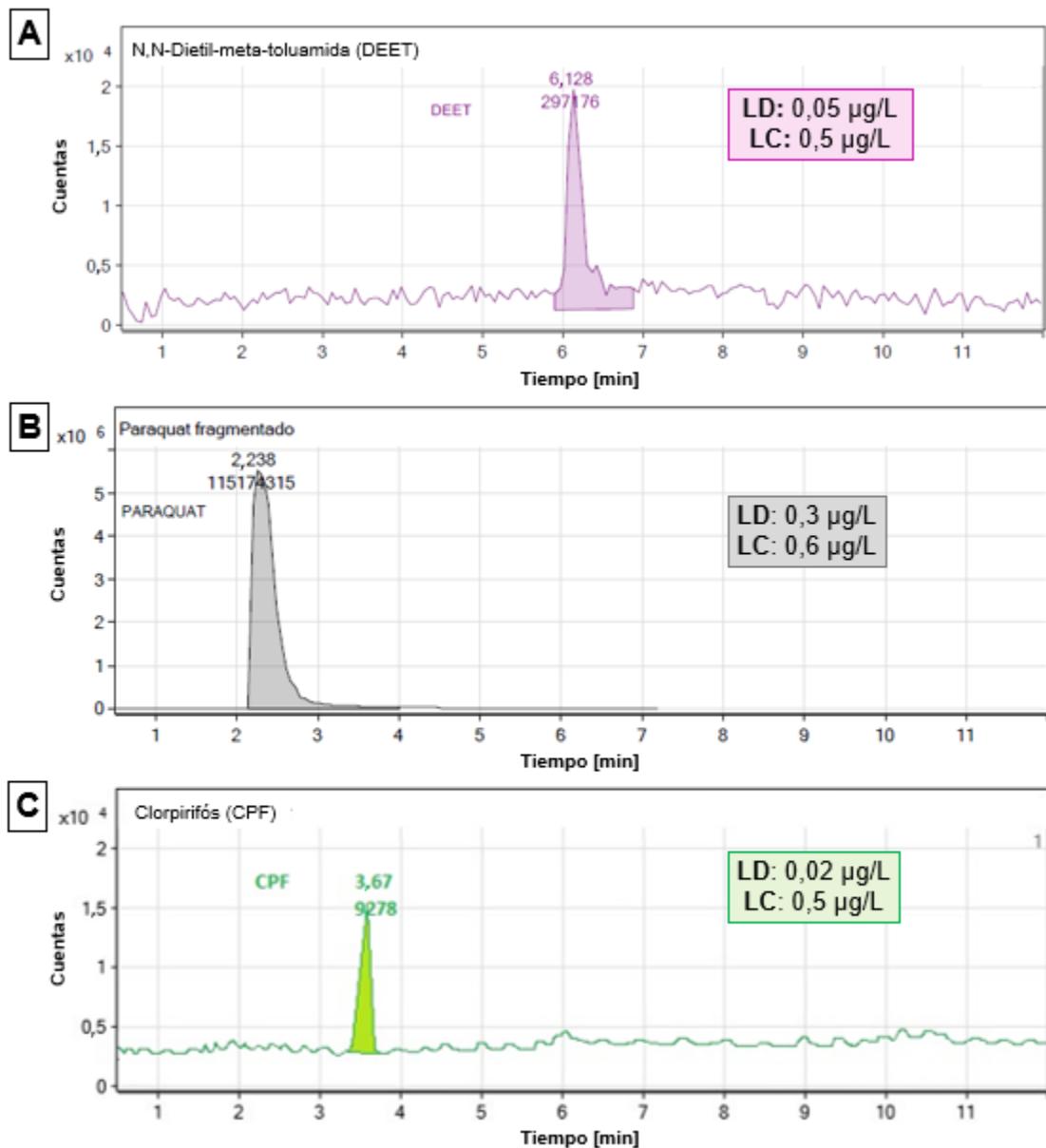


Figura 23. Cromatogramas correspondientes a muestras en las que se detectaron plaguicidas durante la primera campaña invierno 2017. **A:** Cromatograma de N,N-Dietil-meta-toluamida (DEET), **B:** Cromatograma de paraquat, **C:** Cromatograma de clorpirifós (CPF). **LD.** Límite de detección. **LC.** Límite de cuantificación.

Los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) fueron de $0,05$ y $0,5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (DEET); $0,3$ y $0,6 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (paraquat) y $0,2$ y $0,5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (clorpirifós). En la Tabla 6 se detallan los plaguicidas identificados y cuantificados en cada uno de los sitios de muestreo.

Tabla 6. Concentraciones de plaguicidas registradas durante la campaña invierno 2017.

Plaguicidas ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	Sitio de muestreo	Sitio A	Sitio B	Sitio C
Clorpirifós		<0,2	<0,2	4,94
DEET		<0,05	3,13	4,37
Paraquat		<0,3	<0,3	3,36

Sitio A: tributario aguas arriba cercano a zona residencial; **Sitio B:** frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas; **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo.

En el Sitio A, las determinaciones de los 177 plaguicidas analizados estuvieron por debajo del LD de la técnica analítica. En el Sitio B se identificó y cuantificó DEET mientras que en el Sitio C se identificaron y cuantificaron los plaguicidas DEET paraquat y clorpirifós.

A partir de la segunda campaña el estudio se circunscribió al análisis de la presencia y concentración del herbicida glifosato y del insecticida clorpirifós, ya que ambos pesticidas son los más utilizados en el país. En la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** se muestran las concentraciones de clorpirifós y glifosato cuantificadas a partir de la segunda campaña en adelante. Los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) fueron de 0,5 y 1,0 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ respectivamente, para ambos plaguicidas.

Tabla 7. Concentración de plaguicidas identificados y cuantificados en los tres sitios de muestreo durante las diferentes estaciones climáticas (primavera 2017 – otoño 2019).

Campañas de muestreo	Clorpirifós ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)			Glifosato ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)		
	Sitio A	Sitio B	Sitio C	Sitio A	Sitio B	Sitio C
Primavera 2017	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	1,16	2,42
Verano 2018	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,52	0,54
Otoño 2018	<0,5	2,53	<0,5	<0,5	0,81	0,99
Invierno 2018	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,63
Primavera 2018	<0,5	1,00	5,49	<0,5	0,84	1,03
Verano 2019	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	1,05	1,81
Otoño 2019	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,99	1,61

Sitio A: tributario aguas arriba cercano a zona residencial; **Sitio B:** frente a una planta de tratamiento y en el inicio de una zona de huertas; **Sitio C:** aguas abajo del Sitio B y lindero a una zona de huertas de uso intensivo.

Los niveles de clorpirifós y glifosato resultaron no detectables en el Sitio A en todos los muestreos. Por el contrario, en los Sitios B y C se determinaron concentraciones de 1 a 5,5 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de clorpirifós y de 0,8 a 2,4 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de glifosato en algunas campañas de muestreo.

1.6. Discusión

La interacción de los factores climáticos, hidrogeológicos y fisicoquímicos determinan la composición hidroquímica de los sistemas naturales. Las concentraciones de los iones bicarbonatos y carbonatos dentro del sitio de estudio derivan de un proceso de meteorización donde la concentración de bicarbonato en equilibrio con la atmósfera se encontró sobresaturada para las presiones parciales entre 10^{-2} y $10^{-3,5}$ atm en equilibrio con calcita. Esto podría deberse a la carga orgánica, a la respiración de los organismos y a las aguas subterráneas ricas en CO₂ (Stumm y Morgan, 1996; Dai *et al.*, 2006).

Para la clasificación de las aguas, según la composición de iones, se utilizó el diagrama de Piper, donde el tipo de agua corresponde a bicarbonatada sódica. Este resultado coincide con los obtenidos en el diagrama de Stiff, con el PCA de los iones mayoritarios y con los informados por otros autores al caracterizar el agua de las lagunas pampásicas, quienes afirman que dichos cuerpos de agua presentan una concentración elevada de sodio, de haluros solubles y de bicarbonatos, y un valor elevado de dureza (Miretzky *et al.*, 2001; Volpedo y Fernández Cirelli, 2013).

En el diagrama de Schoeller-Berkaloff, se puede observar que predomina el sodio entre los cationes y el bicarbonato entre los aniones, en todos los sitios de muestreo. Al mismo tiempo, la concentración de todos los iones, a excepción de carbonatos, fue menor en el Sitio A que en el Sitio B y el Sitio C, resultados que coinciden con los obtenidos en el PCA, donde se observó que la agrupación de los Sitios B y C se encontraba asociada a las concentraciones de los iones mayoritarios. Las diferencias de composición observada entre los sitios de muestreo podrían deberse al aporte de compuestos de origen antrópico debido a los desechos industriales, urbanos y a la actividad agrícola.

Para identificar la relación de los procesos geoquímicos asociados a la composición del agua, se graficó los TDS en función a los cationes. Los datos obtenidos se encontraron por fuera del boomerang propuesto por Gibbs, pero dentro del diagrama modificado por Wetzel. Sin embargo, al graficar los TDS en función de los aniones todas las estaciones muestreadas se ubicaron en la zona media del boomerang. Este resultado concuerda con los reportados por otros autores en otros cuerpos de agua de la llanura pampeana (Reynoso y Andriulo, 2013; Volpedo y Fernández Cirelli, 2013). En otros estudios en los que se ha

aplicado el diagrama de Gibbs en aguas superficiales del hemisferio sur (Africa) donde la concentración de TDS es mayor que $1,0 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, se obtuvieron los mismos resultados, ubicándose los puntos por fuera del boomerang (Kilham, 1990).

En la subcuenca Las Catonas, todos los sitios de muestreo se ubicaron en la zona media del boomerang, es decir que su composición iónica estaría determinada por la meteorización del material original (la roca) en coincidencia con lo señalado por otros autores en estudios de aguas pampeanas (Sainato *et al.*, 2003; Martínez y Osterrieth, 2013). El análisis de las relaciones iónicas en estos cuerpos de aguas determina la existencia de un proceso de intercambio catiónico entre Ca^{2+} y Na^+ .

De acuerdo con los valores medios de temperatura reportados durante las campañas, se observan dos períodos: un período frio con un rango de temperatura entre $10,2^\circ\text{C}$ y $13,6^\circ\text{C}$, que corresponde a las estaciones de invierno y otoño. Y un período cálido con un rango de temperatura entre $19,6^\circ\text{C}$ y $23,1^\circ\text{C}$ en las estaciones de primavera y verano.

El valor de pH promedio más bajo corresponde a invierno 2017 con un valor de 7,47 (con un rango de variación entre estaciones de 7,10-7,60). En verano del 2018 se registró el valor medio más alto, 8,17 (con un rango de variación entre 7,66 y 8,88). En verano, la evaporación produce pérdida de CO_2 hacia la atmósfera, con un aumento del pH en los cuerpos de agua. Los valores de pH hallados concuerdan con los correspondientes a cuerpos de agua de características similares a las de la subcuenca Las Catonas, siendo posiblemente los carbonatos y bicarbonatos la razón por la cual se obtienen estos valores altos (Miretzky *et al.*, 2001).

En relación al OD, se observó un patrón de variación estacional, donde el OD disminuyó al aumentar la temperatura. Los valores menores de OD en los Sitios B y C pueden deberse a un alto consumo de oxígeno de la comunidad microbiana aeróbica para oxidar la materia orgánica presente en el cuerpo de agua. Este consumo de OD puede exceder los niveles de su producción por procesos fotosintéticos o de la incorporación desde la atmósfera. Asimismo, la actividad microbiana aumenta las concentraciones de CO_2 disuelto en el agua generando la formación de ácido carbónico, bicarbonato y carbonato, determinando un aumento de la concentración de protones que lleva a una acidificación del sistema. Sin embargo, los valores de pH obtenidos tuvieron una tendencia hacia la alcalinidad

confirmando que este parámetro estaría relacionado con la composición química del cuerpo de agua.

Los valores de conductividad y TDS en el Sitio A fueron menores que en los Sitios B y C. Algunos autores afirman que los productos de uso doméstico (por ejemplo, jabones, detergentes, alimentos, entre otros) y agrícolas (por ejemplo, fertilizantes, abonos, plaguicidas, entre otros) pueden alterar el contenido de iones y de materiales disueltos alterando la conductividad (Primavesi, 2002; Lombardo *et al.*, 2010). Por lo tanto, las diferencias observadas entre los sitios de estudio posiblemente estén asociadas al desarrollo de estas actividades.

Se observaron mayores concentraciones de nitrito, nitrato, amonio y fósforo inorgánico en los Sitios B y C que en el Sitio A. De las concentraciones de nitritos obtenidas durante todas las campañas, el 37% de las obtenidas para el Sitio A y el 100% de las correspondientes a los Sitios B y C excedieron los límites permitidos ($0,06 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) para la protección de la vida acuática de acuerdo con Ley de Residuos Peligrosos N°24051, decreto 831/93 (LRPA, 1993); AIC y SGA (1996); SRHN (2005) e INA (2011). A la vez, teniendo en cuenta los niveles establecidos para amonio ($1,37 \text{ mg NH}_4^+ \times \text{L}^{-1}$ (Ley N°24051), $<0,8 \text{ mg NH}_4^+ \times \text{L}^{-1}$ (INA, 2011) y $<0,5 \text{ mg NH}_4^+ \times \text{L}^{-1}$ (SRHN, 2005)), el 88 % de las determinaciones realizadas tanto en el Sitio B como en el Sitio C excedieron los niveles establecidos por la Ley N°24051. Asimismo, el 88 % de las concentraciones obtenidas en el Sitio B y el 100 % en el Sitio C excedieron los niveles establecidos por INA (2011) y SRHN (2005). Para los niveles de fósforo inorgánico, el 100% de las mediciones en los tres sitios de estudio fueron superiores a los niveles máximos establecidos por INA (2011) ($0,01 \text{ mg PO}_4^{3-} \times \text{L}^{-1}$) y por SRHN (2005) ($0,05 \text{ mg PO}_4^{3-} \times \text{L}^{-1}$).

El PCA de los parámetros fisicoquímicos temperatura, conductividad, OD, pH, alcalinidad, dureza, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , DQO, fósforo inorgánico y turbidez, evidenció diferencias entre los sitios de estudio asociadas al estado trófico producido por la contaminación, donde los Sitios B y C presentaron mayores concentraciones de nutrientes con respecto al Sitio A. Los Sitios B y C podrían recibir efluentes de la planta de tratamiento, fertilizantes y plaguicidas debido a la actividad agrícola desarrollada en la zona, los cuales podrían estar incrementando las concentraciones de estos parámetros. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que reportan mayor concentración de nutrientes en la cuenca media

con respecto a la cuenta alta del río Reconquista (Rigacci *et al.*, 2013) y una alta concentración de amonio en el agua superficial del arroyo Las Catonas (Cantera *et al.*, 2022).

El PCA mostró una distribución espacial que coincide con el análisis de clúster, donde se evidencia una diferencia entre los sitios como también diferencias entre estaciones. Las muestras tomadas en invierno y otoño se agruparon en la parte inferior del gráfico, mientras que las correspondientes a verano y primavera se ubicaron en la parte superior. El dendograma obtenido a partir del análisis de clúster evidenció una relación de estos parámetros con la variación estacional. Sin embargo, algunas muestras correspondientes a otoño no se ajustaron a un patrón claro coincidiendo con los resultados reportados por otros autores al aplicar el mismo análisis en cuerpos de agua de la llanura pampeana (Castañé *et al.*, 2006).

El análisis de los parámetros fisicoquímicos de los diferentes sitios de estudio permitió evidenciar dos factores de variación: un factor temporal relacionado con la variación estacional como la temperatura, las precipitaciones y el caudal; y un factor espacial asociado a las actividades antropogénicas. La interacción de estos factores determina la calidad del agua y el grado de eutrofización, coincidiendo con los resultados reportados por otros autores en ríos de la llanura pampeana (O’Farell *et al.*, 2002; Esquius y Escalante, 2012; Fernández Cirelli *et al.*, 2014).

Los resultados del PCA demuestran un agrupamiento de los sitios de muestreo en función de la calidad fisicoquímica del agua, evidenciándose un deterioro de la misma en los sitios asociados a las actividades antropogénicas.

Con respecto a las concentraciones de NiT y PiT, se observaron mayores niveles de estos parámetros en los Sitios B y C que en el Sitio A. Tanto el NT como el PT pueden modificar sus concentraciones en los cuerpos de agua superficiales debido a la erosión hídrica o por escurreimiento superficial (Gabellone *et al.*, 2003). Los mecanismos que transportan el fosfato de los suelos a los sistemas acuáticos pueden modificar las concentraciones de los mismos de acuerdo a las condiciones climáticas (Sande *et al.*, 2005). Este no pareciera ser el factor que incide de forma relevante en los valores determinados durante el estudio. Se encontraron concentraciones elevadas incluso en las estaciones donde se podría presentar

un efecto de dilución debido a los mayores niveles de precipitación y el aumento consecuente del caudal. Los resultados sugieren que sería la actividad intensiva de las huertas el principal factor que determina estos niveles.

En diferentes estudios en sistemas léticos, se ha establecido el estado trófico de los cuerpos de agua en función de los rangos de NT y PT (que incluyen las fuentes de N y P tanto inorgánicas como orgánicas), el cual puede variar entre eutrófico ($0,60 - 1,50 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ para NT y $0,02 - 0,10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ para PT) e hipertrófico (concentraciones mayores que $1,50 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ para NT y mayores que $0,10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ para PT) (Quirós *et al.*, 2002; Schenone *et al.*, 2008; Volpedo y Fernández Cirelli, 2013). Como una aproximación se compararon estos rangos con los valores de NiT y PiT medidos, teniendo en cuenta que los mismos son inferiores a los valores de NT y PT de los correspondientes sitios estudiados. Las concentraciones medias de NiT en el Sitio A estuvieron en el rango de $<0,10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (invierno 2017) a $1,55 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (otoño 2018); entre $3,92 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (primavera 2018) y $9,16 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (otoño 2019) en el Sitio B; y entre $4,07 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (primavera 2018) y $8,34 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (verano 2018) en el Sitio C. Las concentraciones medias de PiT en el Sitio A estuvieron en el rango de $0,21 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (invierno 2018) a $1,13 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (verano 219); entre $0,35 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (invierno 2017) y $2,66 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (otoño 2019) en el Sitio B; y entre $0,37 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (invierno 2017) y $1,84 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (otoño 2019) en el Sitio C. En este contexto, los niveles de NiT para el Sitio A correspondieron al estado de eutrófico, y en los Sitios B y C al estado de hipertrófico. Paralelamente, considerando que los valores de PiT en todos los sitios de muestreo y en todas las estaciones se encontraron en el rango de hipertrófico, se considera a los tres sitios de este cuerpo de agua como hipertróficos (ya que superan los rangos de eutrofización aún sin considerar los compuestos orgánicos). Estos resultados son coincidentes con los reportados en otros estudios de la llanura pampeana donde se afirma una tendencia hacia la hipertrofia en estos cuerpos de agua a partir de las últimas décadas (Volpedo y Fernández Cirelli, 2013).

Los niveles de metales registrados mostraron en el caso del Al y el Fe un perfil similar a lo largo de las campañas, en las que las concentraciones del Sitio A fueron mayores que en los Sitios B y C. Estas concentraciones encontradas pueden deberse a aportes naturales. El Al es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre, está presente en minerales, rocas y arcillas, razón por la cual este metal está presente prácticamente en todas las aguas naturales. Por otro lado, la concentración de Fe soluble se encuentra en

niveles muy bajos en los cuerpos de agua, ya que el hierro presente en suelos y minerales se halla principalmente como óxido férrico insoluble y sulfuro de hierro (pirita) (Sawyer *et al.*, 2001). Con respecto a los niveles guía para la protección de la vida acuática, el 100% de las determinaciones de Al se encontraron por encima de los valores establecidos por la Ley de Residuos Peligrosos (LRPA, 1993) ($5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$), y el 38% de las determinaciones de Fe en las muestras del Sitio A se encontraron por encima de los niveles guía AIC y SGA (1996) ($300 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$). Estas concentraciones no solo pueden deberse a aportes naturales, sino también a aportes de actividades antropogénica desarrolladas aguas arriba del Sitio A, que podrían no encontrarse en las cercanías de los Sitios B y C.

Las concentraciones de Li, V, Mn, Se, Rb, Sr, Ba en el Sitio B y el Sitio C fueron mayores que en el Sitio A. Las concentraciones de Li de origen natural en el ambiente son muy bajas, tanto en los suelos como en los cuerpos de agua, y no superan los niveles guía para la protección de la vida acuática, como tampoco los niveles de V. Para Se, se evidenció que el 13% de las muestras del Sitio A, el 75% del Sitio B y el 100% del Sitio C se encontraron por encima de los niveles guía para la protección de la vida acuática propuestos por la Ley de Residuos Peligrosos (LRPA, 1993) ($1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$). Asimismo, el 25% de las muestras del Sitio C para Mn presentaron valores mayores a los permitidos por esta entidad reguladora ($100 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$). Esta mayor concentración determinada en los Sitios B y C posiblemente se deba al vertido de efluentes provenientes de la planta de tratamiento o actividades antropogénicas aguas arriba de estos sitios de muestreo. Es de destacar que estas entidades reguladoras no contemplan valores guía para todos los metales presentes en los sistemas acuáticos, entre ellos estroncio y rubidio.

Para los metales As, Co, Ni, Zn, Cd, Pb se observaron variaciones aleatorias en las concentraciones a lo largo de las diferentes campañas sin evidenciar un patrón espacial definido, posiblemente debido a la intermitencia del vertido de efluentes. Estos resultados coinciden con los reportados en estudios previos en los que se determinó la concentración de metales en la cuenca media del Río Reconquista (Salibián 2006; Rigacci *et al.*, 2013). Las concentraciones de varios de estos metales posiblemente se deban a actividades antropogénicas desarrolladas en la zona, ya que sus niveles no presentan diferencias notorias entre los tres sitios. Por otra parte, la presencia de As posiblemente tenga principalmente un origen natural, debido a las características geológicas del sitio de estudio,

ya que este metal está presente en los suelos pampeanos debido a su origen volcánico (Blanco *et al.*, 2006; Rosso *et al.*, 2011).

La presencia de metales en los sistemas acuáticos puede generar efectos tóxicos sobre la biota acuática. El Cu, Fe y Zn, entre otros, son metales esenciales, necesarios para procesos biológicos, pero al encontrarse en concentraciones elevadas causan un alto nivel de toxicidad (Abadi *et al.*, 2014). El Al, Pb, Cd y otros, incluso a bajas concentraciones pueden causar daño sobre los tejidos de los organismos (Sfakianakis *et al.*, 2015). Diferentes autores, han informado en peces daño epitelial, descamación, aneurisma, alteraciones respiratorias, endocrinas, reducción en el crecimiento, deficiencias en el comportamiento social y de escape, entre otros, después de la exposición a estos metales (Shahbaa *et al.*, 2020; Zeitoun y Mehana, 2014; Green y Planchart, 2018). Es relevante mencionar que en las determinaciones realizadas para todos estos metales (Cu, Fe, Zn, Al, Pb y Cd) en el presente estudio, se observó un porcentaje de valores que superaron los niveles establecidos para la protección de la vida acuática propuestos por la Ley de Residuos Peligrosos (LRPA, 1993). Es de destacar, dadas sus características toxicológicas, que se encontraron niveles elevados de Cu, Cd, Pb y Zn. Previamente, Herrero (2006) determinó la presencia de estos metales en muestras de agua superficial de diferentes sitios de la subcuenca Las Catonas.

En el relevamiento de 177 plaguicidas realizado durante la primera campaña (invierno 2017) ya se observó una diferencia entre los sitios de muestreo. En el Sitio A no se identificó la presencia de ninguno de los compuestos evaluados. En el Sitio B se determinó la presencia de un sólo compuesto y en el Sitio C se determinó la presencia de tres compuestos.

Uno de los compuestos identificados fue el DEET (N, N-dietil-meta-toluamida). Se cuantificaron niveles de $3,13 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y $4,37 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de DEET en los Sitios B y C, respectivamente. El DEET, descubierto en 1953, es un repelente de amplio espectro muy utilizado en productos de cuidado personal, altamente efectivo contra varias especies de mosquitos *Anopheles*. Además, es activo contra especies de insectos y ácaros como simúlidos, moscas, chinches de cama, pulgas, garrapatas, entre otros (Moore *et al.*, 2006). Dado su amplio uso, este compuesto puede representar una fuente de exposición tanto para los humanos como para los sistemas acuáticos. El DEET ha sido detectado en cuerpos de agua de todo el mundo, arroyos, agua de mar, aguas residuales, agua subterránea, lo

que indica que este compuesto es móvil y persistente (Costanzo *et al.*, 2007). Años atrás, se consideraba muy poco probable que el DEET ingresara a los ecosistemas acuáticos. En este sentido, en la hoja de seguridad de este compuesto no se lo considera como un riesgo ecológico. En este marco, la información sobre la toxicidad ecológica del DEET es escasa, faltando evaluaciones ecotoxicológicas sistemáticas para este biocida (Sun *et al.*, 2016).

Otro de los compuestos identificados en el Sitio C fue el paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), registrándose una concentración de $3,36 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$. El Paraquat es un herbicida ampliamente utilizado en Argentina. Su uso está ampliamente extendido para el control de malezas y se ha encontrado en cuerpos de agua por procesos de escorrentía y lixiviación (Ibáñez *et al.*, 1996). Se sintetizó por primera vez en 1882, en 1955 se reconocieron sus propiedades como herbicida y en 1961 se empezó a comercializar (PAN UK, 1996). Actúa por contacto de forma rápida sobre el follaje de la planta sin afectar el tallo. Ha sido clasificado como moderadamente peligroso (US EPA 1987). Las formulaciones comerciales de este plaguicida están clasificadas como altamente tóxicas en la mayoría de los países donde está permitido su uso (Anzalone, 2008). Este compuesto al descomponer los tejidos es adsorbido por los sedimentos, material en suspensión y por la vegetación acuática. Al ser soluble en agua y adsorberse a la materia orgánica, puede ocasionar efectos tóxicos de forma directa o indirecta en los sistemas acuáticos (Gagneten, 2002).

El tercer compuesto identificado en el Sitio C durante la primera campaña fue el clorpirifós (CPF), en una concentración de $4,94 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$. Considerando la dificultad para acceder al equipamiento requerido para la determinación de plaguicidas y teniendo en cuenta los plaguicidas organofosforados más utilizados en el país, a partir de la segunda campaña se identificaron y cuantificaron en las muestras los niveles de glifosato y clorpirifós. Los mayores niveles de clorpirifós identificados en las muestras ambientales fueron de $5,49 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para el Sitio C y $2,53 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para el Sitio B. Los niveles de clorpirifós resultaron no detectables en el Sitio A durante todas las campañas.

Para el glifosato (PMG), se determinaron concentraciones máximas cercanas a los $2,5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ en el Sitio C. De las muestras analizadas, en el 17% se identificó la presencia de CPF y en el 54% de PMG, en ambos casos en el orden de los ppb. Como se mencionó anteriormente estos, plaguicidas han sido muy utilizados en el país para la producción de

cultivos de soja y trigo. El uso intensivo de los mismos, tanto en aplicaciones individuales como en mezclas, puede causar daños ecotoxicológicos en los sistemas acuáticos.

Algunos autores, han catalogado las aguas residuales como una fuente principal de emisión de biocidas (Heeb *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Un porcentaje de estas sustancias se descarga luego de su uso en aguas residuales que llegan a las plantas de tratamiento a través de la red de alcantarillado. Se han reportado la presencia de biocidas en afluentes y efluentes de las plantas de tratamiento (Glassmeyer *et al.*, 2005; Costanzo *et al.*, 2007; Bollmann *et al.*, 2014).

Los resultados reportados en este capítulo ponen en evidencia la importancia de realizar monitoreos periódicos que permitan evaluar la calidad del agua y la influencia de la actividad industrial y agrícola en la zona. Los monitoreos de la calidad del agua en los sistemas acuáticos usualmente se basan en el estudio de diferentes variables fisicoquímicas. Estos monitoreos tienen una desventaja en el diagnóstico de las condiciones del sistema que puede ser incompleto o inexacto, ya que la presencia de los contaminantes en los cuerpos de agua depende del momento en el que se colectan las muestras (Abel, 1996). Por lo tanto, es relevante complementar esta información con estudios ecotoxicológicos que permitan evaluar la toxicidad y efectos de estos contaminantes sobre organismos acuáticos no blanco como los peces.

1.7. Conclusiones

La composición hidroquímica en los sitios estudiados de la subcuenca Las Catonas corresponde a bicarbonatada sódica, y concuerda con la composición del agua de las lagunas pampásicas.

La determinación de los parámetros fisicoquímicos en los diferentes sitios de estudio evidenció dos factores posibles de variación, un factor estacional y un factor espacial, que podrían estar asociados a las actividades antropogénicas desarrolladas en las inmediaciones de los diferentes sitios. La interacción de estos factores determina la calidad del agua y el grado de eutrofización, reflejado en los mayores valores de la concentración de fosforo inorgánico total y nitrógeno inorgánico total.

La concentración de metales disueltos determinadas en los sitios de estudio superó en mucho de los casos los niveles guía establecidos para la protección de la vida acuática, lo que posiblemente se deba a actividades antropogénicas desarrolladas aguas arriba de los sitios de muestreo y/o a los efluentes provenientes de la planta de tratamiento, sin evidenciarse en algunos de ellos un patrón espacial definido.

Se identificó la presencia de 4 plaguicidas: DEET, paraquat, clorpirifós y glifosato. Si bien la presencia de plaguicidas en aguas superficiales puede deberse a eventos puntuales, estos resultados ponen en evidencia la importancia de realizar monitoreos periódicos que permitan evaluar la calidad del agua y la influencia de la actividad industrial y agrícola en la zona. Asimismo, es importante complementar esta información con estudios ecotoxicológicos que permitan evaluar la toxicidad y los efectos de estos contaminantes sobre especies no blanco.

Capítulo 2

Capítulo 2. Evaluación de neurotoxicidad: Efectos de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en peces dulceacuícolas.

2.1. Introducción

Durante las últimas décadas se consolidó un modelo intensificado de producción en el país, tendiente hacia una agricultura continua, lo que ha llevado a una expansión de la frontera agrícola y la aplicación de un paquete tecnológico basado en la siembra directa, la utilización de semillas genéticamente modificadas, y el mayor uso de plaguicidas (Satorre, 2005; Leguizamón, 2014), siendo los herbicidas de amplio espectro como el glifosato, y los insecticidas como el clorpirifós, los más utilizados (FAO, 2020).

Estos plaguicidas y otros contaminantes pueden ser transportados por escorrentía a áreas más bajas del terreno llegando a los sistemas acuáticos (Aparicio *et al.*, 2015). El río Reconquista forma parte de una de las tres grandes cuencas de la Región Metropolitana de Buenos Aires (Argentina) y, al igual que la mayoría de los ríos que atraviesan zonas urbanas, está gravemente impactado por la contaminación debida a las descargas de aguas residuales de residencias e industrias (Potocko, 2017) y a la actividad agrícola (Defensor del Pueblo de la Nación, 2007). Aproximadamente el 10% de la población del país está asentada alrededor de su cauce principal y red de drenaje (Salibián, 2006). El arroyo Las Catonas, uno de los principales tributarios de esta cuenca, y sus afluentes se extienden casi en su totalidad en el Partido de Moreno.

Para definir los plaguicidas a utilizar en los estudios ecotoxicológicos se tuvieron en cuenta aquellos asociados a los cultivos de gran importancia económica en la región pampeana, como soja y trigo; y, a la vez, los resultados obtenidos en la identificación de plaguicidas en la subcuenca Las Catonas, Partido de Moreno (Capítulo 1). En este sentido, se seleccionaron clorpirifós y glifosato, dos de los plaguicidas más empleados, que además se encontraron en la zona de monitoreo, para evaluar sus efectos ecotoxicológicos en especies no blanco.

La detección de concentraciones de plaguicidas en aguas superficiales es considerada un primer acercamiento hacia la evaluación del grado de contaminación de un ecosistema

(Rodríguez Aguilar *et al.*, 2019). Diferentes autores han determinado la presencia de plaguicidas, entre ellos clorpirifós y glifosato, en cuerpos de agua de zonas con actividad agrícola. En Argentina, Marino y Ronco (2005) reportaron concentraciones de $10,8 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de clorpirifós en arroyos de la región pampeana asociados a agroecosistemas. En el caso del glifosato Peruzzo *et al.* (2008) informaron concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,7 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$, mientras que Ronco (2011) incluso reportó concentraciones de hasta 10,9 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ en un tributario del arroyo Pescado de la Provincia de Buenos Aires. En otros trabajos, se han detectado concentraciones de glifosato sensiblemente menores en cuerpos de agua de la provincia de Buenos Aires: 4,52 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ en el lago pampeano Chasicó (Castro Berman *et al.*, 2018) 7,60 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ en el arroyo Vivoratá (Aparicio *et al.*, 2013) y la concentración promedio de 0,73 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ en muestras de agua superficiales en cuencas de drenaje del río Gualeguay y Gualeguaychú (Primost *et al.*, 2017). Estos plaguicidas pueden afectar negativamente a especies no-blancas como los peces, por lo que resulta relevante la evaluación de los efectos no deseados sobre los mismos.

2.1.1. Plaguicidas organofosforados.

Los primeros compuestos organofosforados (OP) sintetizados y comercializados fueron desarrollados por el alemán Gerhard Schrader a principios de la década de 1940 (Costa, 2006). Estos compuestos presentan diversas estructuras químicas como ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico y fosfónico. La mayoría son utilizados como plaguicidas, mientras que otros son utilizados como agentes terapéuticos, plastificantes y lubricantes entre otros (Anguiano *et al.*, 2011).

Los OP están formados por un átomo central de fósforo unido con un doble enlace a un átomo de oxígeno o azufre, dos grupos alquílicos (R1 y R2) que contiene grupos metilos, etilos o isopropilos, y un grupo saliente específico de cada organofosforado. En la Figura 24 se muestra la estructura general de los OP.

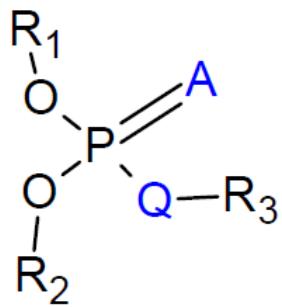


Figura 24. Estructura general de los compuestos organofosforados (OP). Donde R₁ y R₂ son grupos metilo o etilo, A y Q átomos de oxígeno o azufre y R₃ generalmente un grupo fenilo o piridinilo.

Los OP son el grupo de plaguicidas más utilizado en la agricultura, floricultura, y silvicultura en todo el mundo (Gupta, 2007). Existen al menos 13 tipos de OP (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación de organofosforados (OP). Tomado y modificado de Gupta (2007).

Grupos de organofosforados	Estructura	Ejemplos
Fósfatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Diclorvos Monocrotofos
Fosfonatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Triclorfón Glifosato
Fosfinatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Glufosinato
Fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Paratión Fentión Clorpirifós
Fosfonotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Leptofo
Fosforotioatos (S sustituidos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Dementón-S-metil ecotiofato
Fosfonotioatos (S sustituidos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Agente nervioso VX
Fosforoditioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Azinfos metil dimetoato Malatión
Fosforotritioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{SR} \end{array}$	Tribufos
Fosforamidatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Fenamifos
Fosforamidotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \\ \text{OR} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Metamidofos Isofentos
Fosforofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	DFP
Fosfonofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Sarín Somán

Los plaguicidas OP han desplazado a los organoclorados debido a su relativa baja persistencia en el ambiente (Quagliano *et al.*, 2009). No obstante, actualmente se acepta que los OP son más peligrosos de lo que en un principio se pensaba para el ambiente y para los organismos no blanco que en él habitan. Se ha comprobado que la degradación parcial de estos plaguicidas genera subproductos de mayor toxicidad que los compuestos parentales (Vittozzi *et al.*, 2001).

Algunos grupos de plaguicidas OP, o sus metabolitos activos son inhibidores de las enzimas esterasas, entre ellas la acetilcolinesterasa (AChE) presente en el sistema nervioso de los vertebrados e invertebrados (Thompson, 1999).

2.1.1.1. Herbicidas organofosforados.

Son considerados herbicidas a todos los productos fitosanitarios químicos o biológicos utilizados para controlar especies vegetales no deseadas, debido al impacto negativo que ocasionan en la producción y el rendimiento de los cultivos (Faccini y Puricelli, 2007). Los herbicidas pueden alterar la fisiología de las plantas ocasionando en muchos casos la muerte o retardando su crecimiento. El Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (Herbicide Resistance Action Committee -HRAC) ha clasificado a los herbicidas según su modo de acción, la secuencia de eventos que ocurre desde que es absorbido por la planta, hasta la aparición de fitotoxicidad.

Glifosato

En la Argentina, la expansión de la frontera agrícola condujo a un aumento en el uso de plaguicidas (herbicidas, insecticidas, entre otros). De las 196.009 toneladas de plaguicidas que se usaron en la agricultura durante el 2017, el 94% correspondieron a herbicidas (FAO, 2020). El glifosato (N-(fosfonometil) glicina) (PMG) es el herbicida más usado en el país, particularmente en la región pampeana (Aparicio *et al.*, 2013; Bonifacio *et al.*, 2016). Sus propiedades como herbicida fueron descubiertas en 1970 y fue introducido en el mercado en 1974 (Giesy *et al.*, 2000).

Este plaguicida es un ácido orgánico débil, formado por glicina y por un grupo fosfonometilo. Pertenece a los OP del grupo fosfonato, su estructura molecular se presenta en la Figura

25. Este herbicida ha sido categorizado por la Organización Mundial de la Salud en la clase IIA, reconocido como probablemente cancerígeno para los seres humanos (OMS, 2015). En la Tabla 9 se describen sus características fisicoquímicas principales.

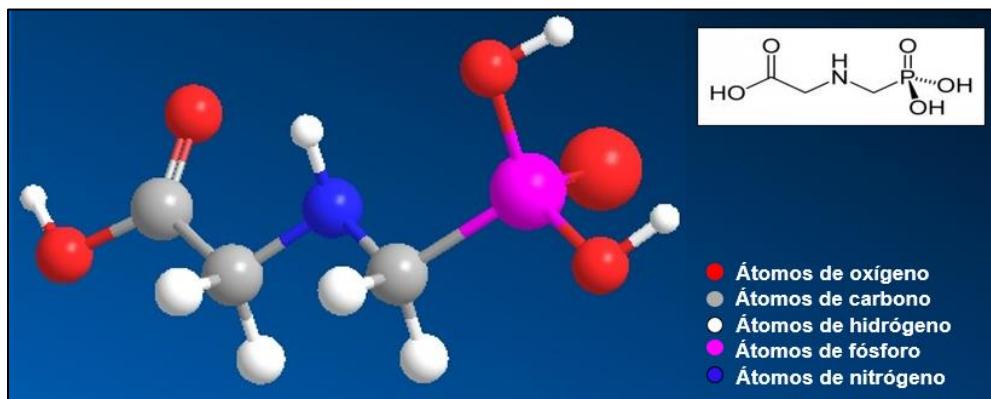


Figura 25. Estructura química del glifosato

Tabla 9. Características fisicoquímicas del glifosato

Características fisicoquímicas	
Nombre químico	Glifosato
Nomenclatura	(N-(fosfonometil) glicina)
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Peso molecular (g/mol)	169,073
pH	2,5 a 10 g/l a 20°C
Punto de fusión (°C)	230°C
Solubilidad	En agua, 10,5 g/l a pH 1,9 y 20°C
Densidad (g/l)	0,56

Mecanismo de acción

El glifosato se aplica de forma directa en los cultivos (post-emergente). Es no selectivo, se usa ampliamente en barbechos, con fitotoxicidad sobre plantas anuales y perennes, no actúa sobre las semillas presentes en el suelo ni es absorbido por las raíces. Es un herbicida sistémico, es decir, es absorbido por vía foliar y luego se desplaza hacia el floema. Una vez que se encuentra dentro del sistema vascular, inhibe la acción de la enzima 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) presente en el cloroplasto, actuando sobre la vía del

ácido shikimato. Esta enzima cataliza la reacción de formación de 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato (EPSP) a partir de shikimato 3-fosfato (S3P) y fosfoenol piruvato (PEP), que constituye un paso necesario para la biosíntesis de una amplia variedad de metabolitos como los aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina, tirosina), el tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (Funke *et al.*, 2006). Esta ruta bioquímica se encuentra solo en plantas y algunos microorganismos (Giesy *et al.*, 2000). Debido a que la estructura del PEP y del glifosato son muy similares en el estado de transición durante la catálisis de la enzima, el glifosato actúa como un inhibidor competitivo de la enzima EPSPS formando un complejo shikimato-enzima-glifosato y ocasionando una acumulación de shikimato en concentraciones tóxicas. En la Figura 26 se muestra la vía metabólica del shikimato y el mecanismo de acción del PMG.

Según la clasificación del HRAC (2022), el PMG se encuentra dentro del grupo 9, debido a que su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima 5 enolpituvil shikimato-3-fosfato (EPSPS).

VÍA METABÓLICA DEL SHIKIMATO Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL GLIFOSATO EN PLANTAS

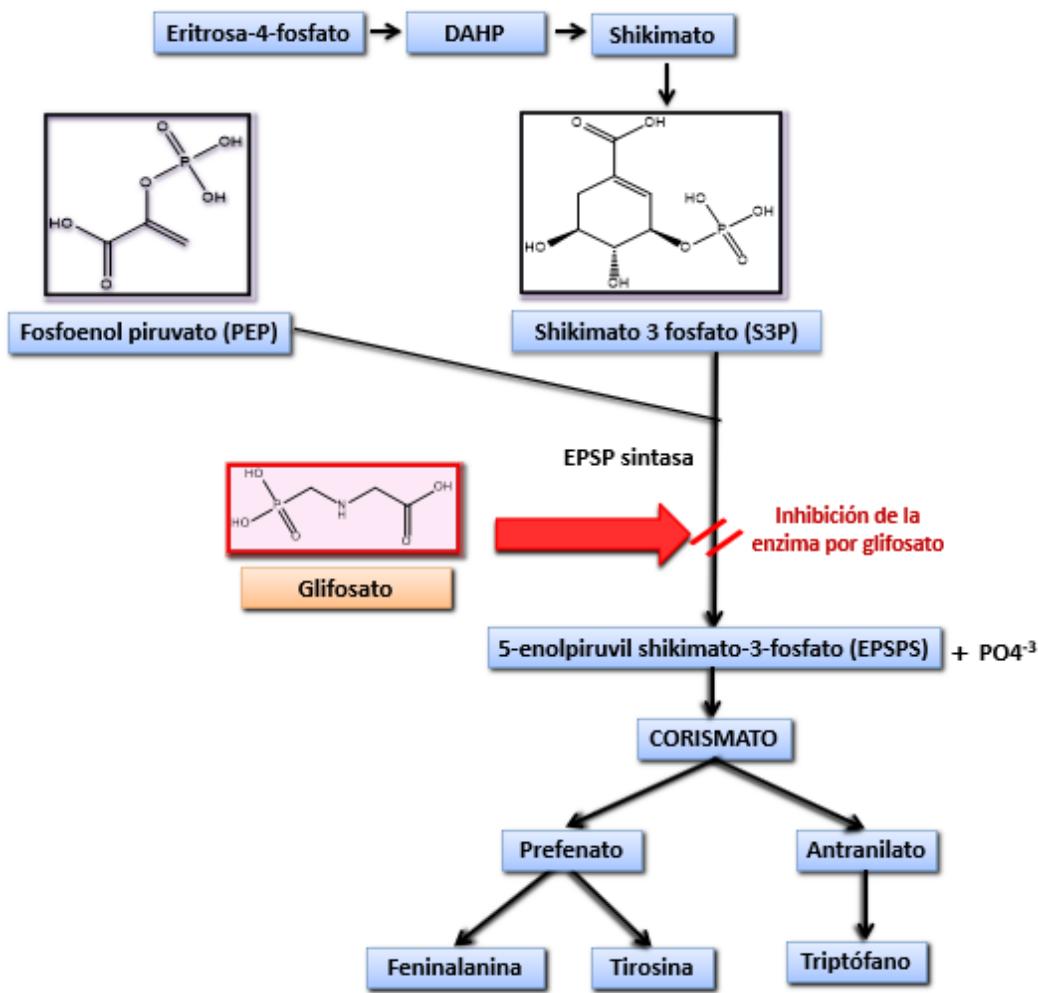


Figura 26. Vía metabólica del shikimato y mecanismo de acción del glifosato en plantas (Tomado de Bernal-Rey, 2018).

Conocer el mecanismo de acción del glifosato ha permitido mediante la ingeniería genética el desarrollo de semillas resistentes a este herbicida.

Por otra parte, algunos autores establecen que el principal metabolito de degradación del glifosato, el ácido aminometilfosfónico (AMPA) es más tóxico y resistente a la degradación que el glifosato, además de ser reconocido como uno de los principales contaminantes de ríos y arroyos (Botta *et al.*, 2009; Ronco *et al.*, 2016). Primost *et al.* (2017) resaltan la

importancia de considerar al PMG y al AMPA como pseudopersistentes, teniendo en cuenta que la tasa de aplicación de estos contaminantes es más alta que su tasa de disipación.

2.1.1.2. Insecticidas organofosforados

Los insecticidas OP han sido el grupo más utilizado durante varias décadas. Son fundamentalmente ésteres del ácido fosfórico.

Muchos de estos compuestos son reconocidos como insecticidas de contacto ya que son absorbidos por medio de los lípidos del caparazón de los insectos (Carod Benedico, 2002). El principal modo de acción de los insecticidas OP es la fosforilación de la enzima AChE en las terminaciones nerviosas. Como resultado, se produce la inhibición de la enzima por parte de este tipo de insecticidas, con la consiguiente acumulación de acetilcolina y sobreestimulación de sus receptores, afectando las sinapsis colinérgicas del sistema nervioso central, todas las terminaciones del sistema nervioso autónomo parasimpático (postganglionares), los ganglios del sistema autónomo (simpático y parasimpático) y las conexiones neuromusculares de la musculatura esquelética (Pérez, 2004; Schlenk *et al.* 2008).

Clorpirifós

El clorpirifós (O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato) (CPF) es un insecticida utilizado para el control de insectos masticadores y chupadores. En Argentina, de las 3.736 toneladas de insecticidas que se usaron en la agricultura en el 2017 el 59% correspondieron a insecticidas OP (FAO, 2020), siendo el CPF el insecticida más utilizado en los cultivos de soja genéticamente modificados (Aparicio *et al.*, 2013). En la Figura 27 se muestra la estructura molecular del CPF. Este insecticida pertenece a los organofosforados del grupo fosforotioatos. Ha sido categorizado por la Organización Mundial de la Salud en la clase II, como moderadamente tóxico (OMS, 2010). El Comité de Acción de Resistencia a los Insecticidas (IRAC, 2021) clasificó al clorpirifós según el modo de acción dentro del grupo 1B, organofosforados inhibidores de la enzima AChE.

En Argentina, a partir de la resolución 414/2021, se ha estipulado que en el 2023 estará prohibido el uso de plaguicidas formulados a base de clorpirifós etil y clorpirifós metil

(SENASA, 2021). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) prohibirá su uso debido a sus efectos adversos sobre el sistema nervioso en humanos (Infobae, 2021). En la Tabla 10 se describen sus características fisicoquímicas.

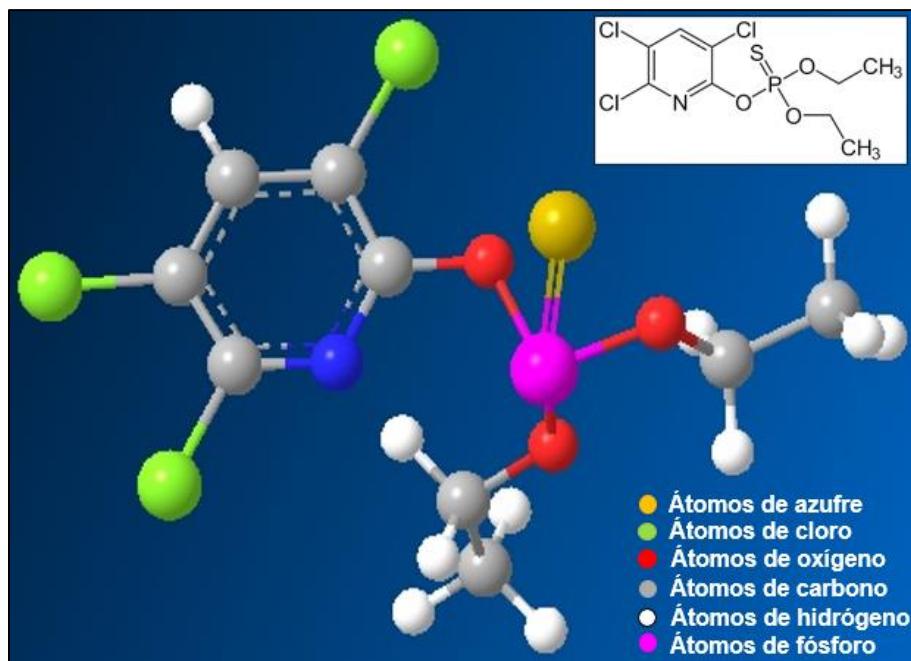


Figura 27. Estructura química del clorpirifós

Tabla 10. Características fisicoquímicas del clorpirifós

Características fisicoquímicas	
Nombre químico	Clorpirifós
Nomenclatura	(O,O-diethyl-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato)
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Peso molecular (g/mol)	350,6
Punto de fusión (°C)	44 – 45°C
Solubilidad	En agua, 0,941 mg/l a 20°C
Densidad (g/cm³)	1,38 a 46°C

Mecanismo de acción

Los OP del grupo fosforotioato presentan el enlace doble entre el fósforo y el azufre (P=S) y poseen una mínima o nula actividad anticolinesterásica, pero al ser bioactivados por análogos oxigenados (P=O) mediados por el sistema enzimático de las monooxigenasas, se genera un aumento en su efecto neurotóxico (Jokanović, 2001). El tipo de compuesto OP en el que el átomo de fósforo está unido por doble enlace a uno de oxígeno (al sustituir un azufre) se denomina oxón. Los oxones son potentes inhibidores de la enzima AChE, y también pueden alterar la función de otras enzimas y proteínas debido a su alta reactividad (Terry, 2012).

El clorpirifós es un insecticida de aplicación foliar y edáfica. Su mecanismo de acción como insecticida se inicia con la biotransformación a clorpirifos oxón (CPF-oxón) mediante diferentes vías metabólicas. En una de estas vías el CPF es bioactivado por medio del sistema microsomal citocromo P450 (CYP) a través de una reacción de desulfuración oxidativa, siendo estas enzimas las que transforman los OP en el metabolito activo (Tang *et al.*, 2001). En la Figura 28 se describen las vías metabólicas del CPF.

BIOTRANSFORMACIÓN DEL INSECTICIDA CLORPIRIFÓS

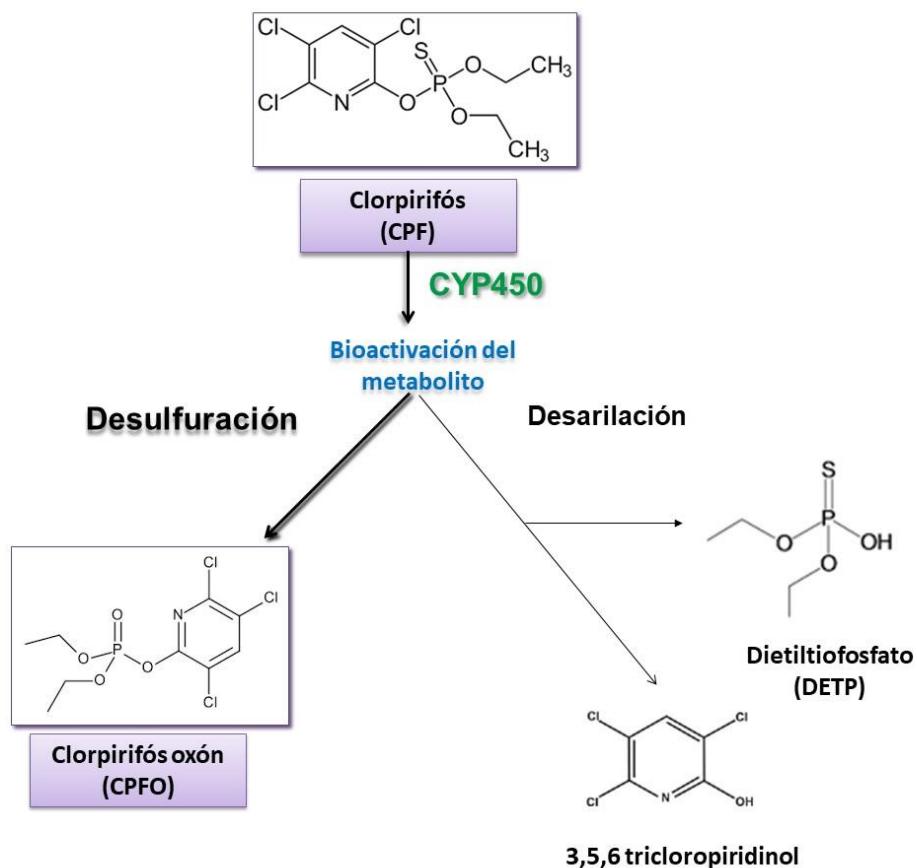


Figura 28. Biotransformación del clorpirifós. **CYP450**: citocromo P450.

El principal mecanismo de acción del CPF está relacionado con la capacidad del metabolito CPF-oxón para inhibir a la enzima AChE, proceso que se describe más adelante en el apartado 2.1.2. En la Figura 29 se muestra la estructura química del CPF-oxón y en la Tabla 11 sus características fisicoquímicas.

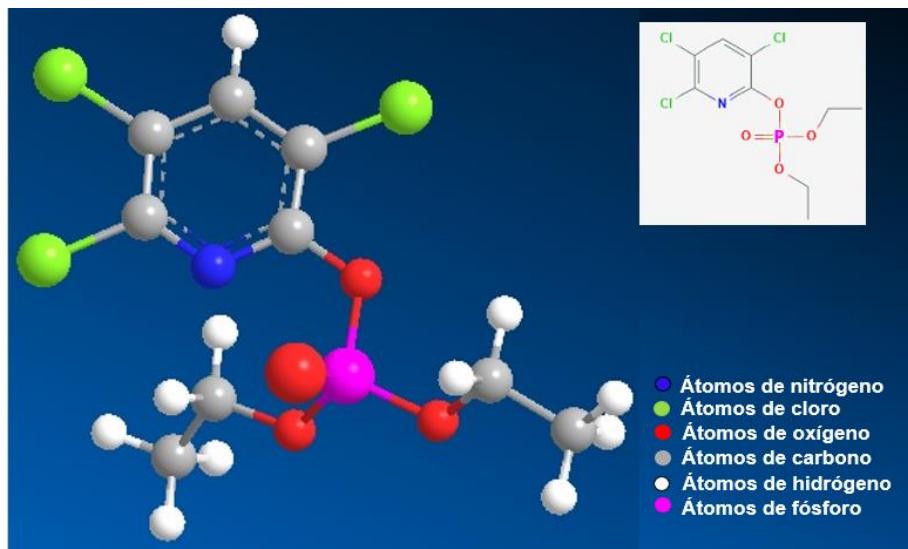


Figura 29. Estructura química del clorpirifós oxón.

Tabla 11. Características fisicoquímicas del clorpirifós oxón.

Características fisicoquímicas	
Nombre químico	Clorpirifós oxón
Nomenclatura	dietil (3,5,6-tricloropirimidin-2-il) fosfato
Fórmula molecular	$C_9H_{11}Cl_3NO_4P$
Peso molecular (g/mol)	334,5
Punto de fusión (°C)	41,3°C
Solubilidad	En agua, 0,52 g/l a 24°C
Densidad (g/cm³)	1,46

2.1.2. Acetilcolinesterasa.

Los impulsos nerviosos entre las neuronas se dan a través de los neurotransmisores, uno de ellos es la acetilcolina conocida como neurotransmisor colinérgico debido a que deriva de la colina. Su síntesis se genera a partir de una molécula de acetil coenzima A y una de colina en una reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa. La AChE, es una enzima que pertenece a la familia de las esterasas. Se encuentra principalmente en neuronas colinérgicas periféricas y centrales, estando presente en dendritas, axones y especialmente concentrada en las sinapsis (Zimmerman y Soreq, 2006). En las Figuras 30A

y 30B se describe su función fisiológica, la cual es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina (ACh) en acetato y colina, regulando su concentración en la sinapsis. La inhibición de la enzima AChE por algunos insecticidas OP (Thompson, 1999) impide la degradación de la ACh endógena que, por lo tanto, se acumula en el espacio sináptico. Esta acumulación, como se muestra en la Figura 30C, genera una sobre-estimulación de los receptores colinérgicos, tanto nicotínicos como muscarínicos. La hiperexcitación colinérgica puede generar parálisis a través del sistema nervioso central (Terry, 2012).

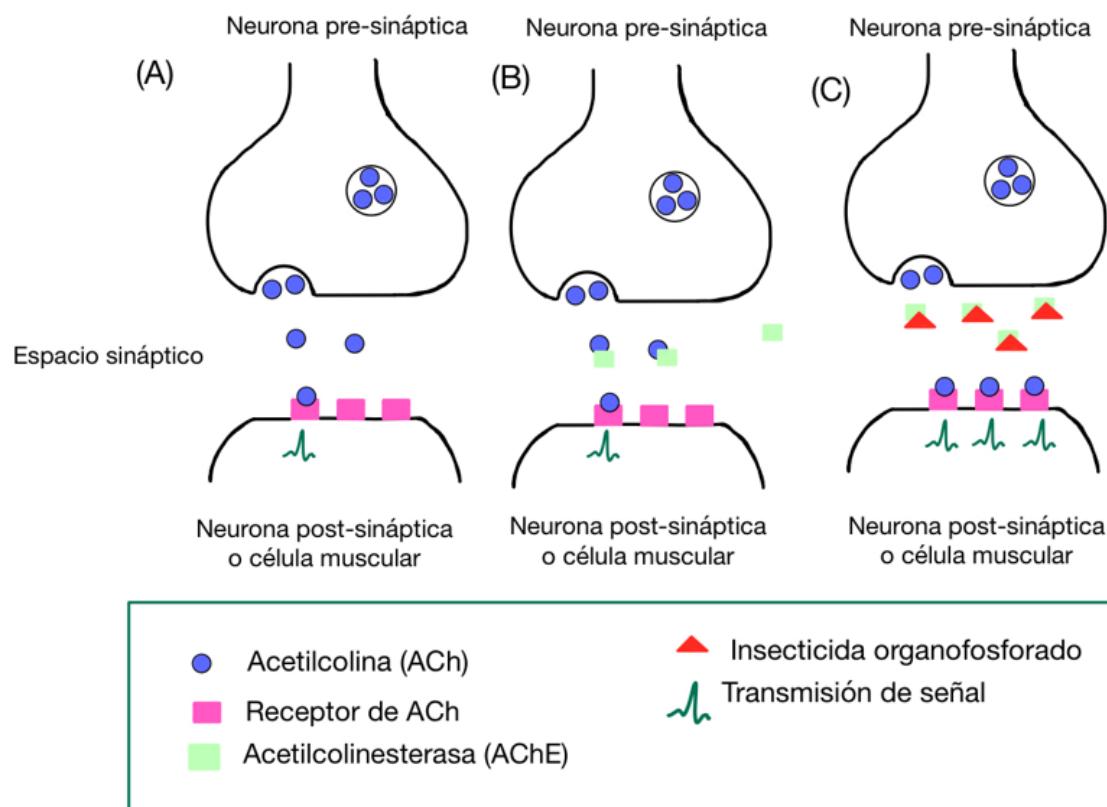


Figura 30. Modo de acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) e inhibición por insecticidas OP. **A.** El neurotransmisor acetilcolina (ACh) se une a los receptores de la membrana post-sináptica. **B.** La enzima AChE hidroliza al neurotransmisor ACh en acetato y colina permitiendo que el estímulo sináptico de la ACh sea breve. **C.** La inhibición de la AChE por la presencia de insecticidas organofosforados impide la hidrólisis de la ACh, produciéndose una sobreestimulación de los receptores. Tomado y modificado de Berger y Anderko (2018).

El principal mecanismo de acción de muchos insecticidas organofosforados, entre ellos el insecticida CPF a través de su metabolito oxón, es la inhibición de la AChE. El grupo fosfato ($P=O$) del CPF-oxón fosforila al grupo hidroxilo de una serina presente en el sitio activo de

la AChE, impidiendo que la enzima cumpla con su rol fisiológico, hidrolizar al neurotransmisor ACh. La unión entre el fósforo y la enzima es mucho más estable que la unión entre el carbono del acetato de la ACh y la enzima. Por lo tanto, la recuperación de la enzima a partir de desfosforilación se realiza de forma muy lenta, constituyendo prácticamente una inhibición de carácter irreversible. Una vez que la enzima ha perdido uno de los grupos alquilo, proceso reconocido como envejecimiento de la enzima, la inhibición es de carácter irreversible, por lo tanto, la única forma de recuperar la actividad es a partir de la síntesis de nueva enzima (Costa, 2006). En la Figura 31 se describe la hidrolisis de la acetilcolina por acción de la enzima AChE y la inhibición de la enzima por acción del CPF-oxón.

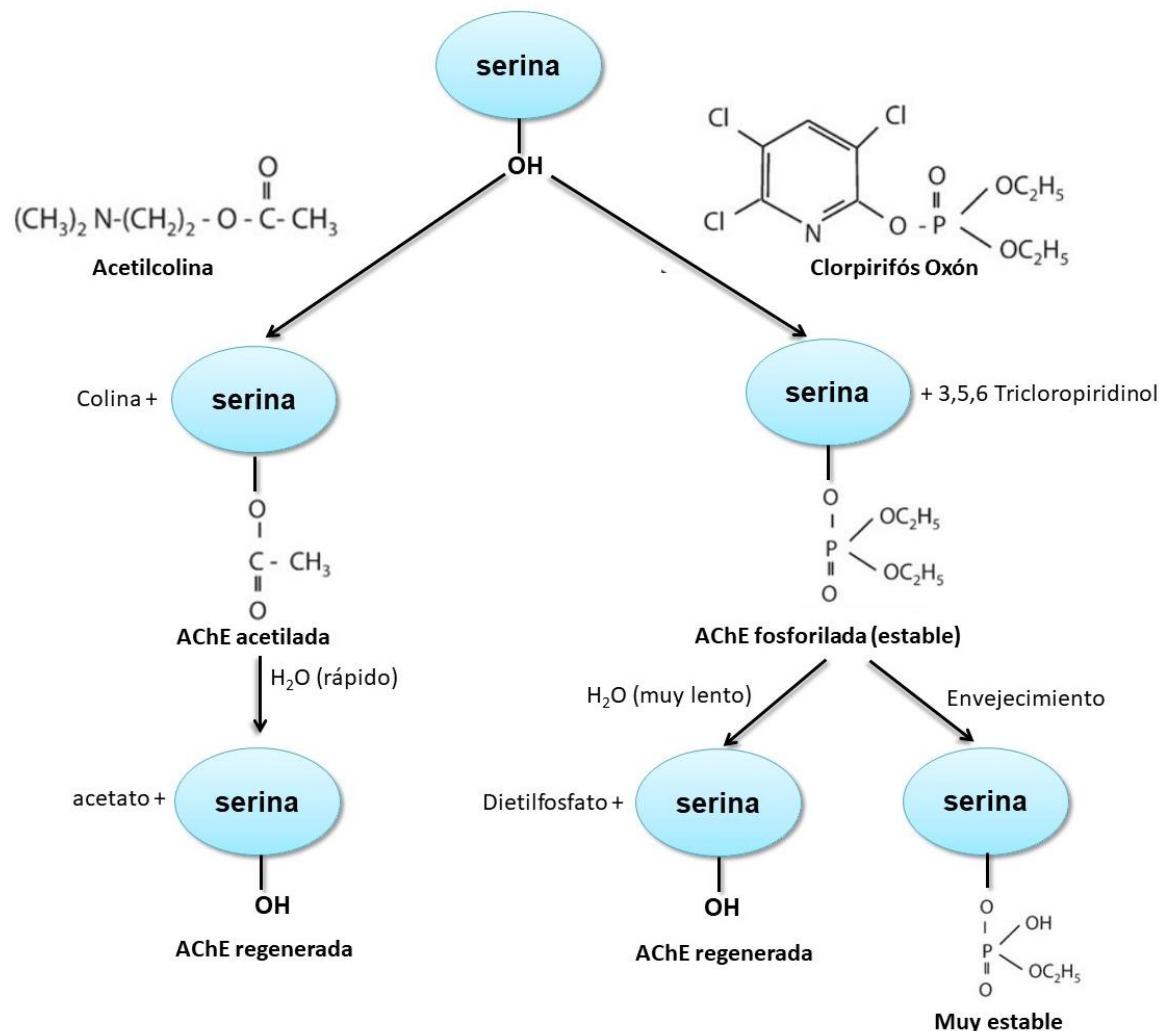


Figura 31. Hidrolisis de la acetilcolina por acción de la enzima AChE e inhibición de la enzima por acción del clorpirifós oxón. Tomado y modificado de Costa (2006).

La enzima AChE ha sido reconocida como parámetro biomarcador de neurotoxicidad, pudiendo su inhibición ocasionar efectos sobre la locomoción y el equilibrio de los animales (Van der Oost *et al.*, 2003).

2.1.2.1. Acetilcolinesterasa como biomarcador de neurotoxicidad

Un biomarcador es cualquier respuesta de un organismo vivo a nivel celular, tisular, bioquímico, fisiológico o del comportamiento, usada de manera cuantitativa para identificar y evaluar los efectos adversos de un determinado contaminante en poblaciones o comunidades naturales (Van der Oost *et al.*, 2003; Gupta, 2014; Kroon *et al.*, 2017).

Los biomarcadores se han utilizado para detectar la exposición a un contaminante y determinar algunas consecuencias biológicas de dicha exposición, analizar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar los organismos sensibles de una población, y así mismo poder tomar medidas de intervención a nivel individual o ambiental (Peña y Ayala-Fierro 2007).

Se ha destacado la importancia de utilizar diferentes biomarcadores bioquímicos y fisiológicos para detectar o diagnosticar efectos subletales en peces expuestos *in situ* o a diferentes contaminantes (Van der Oost *et al.*, 2003; Maggioni *et al.*, 2012), ya que un único biomarcador podría representar un diagnóstico incompleto de la contaminación ambiental.

La actividad de la enzima AChE se ha propuesto como un biomarcador de alteraciones ocurridas en las uniones sinápticas en el sistema nervioso central, neuromusculares colinérgicas y simpáticas, debido a la sensibilidad de la enzima, que es fácil de determinar y muestra un comportamiento dependiente de la dosis del contaminante (Behra *et al.*, 2002; Van Dyk y Pletschke, 2011; Lionetto *et al.*, 2013). La actividad de AChE tanto del cerebro como del músculo, resulta sensible a la exposición de diferentes contaminantes como plaguicidas y metales pesados (Modesto y Martínez, 2010a; Pretto *et al.*, 2010; Milagrosa *et al.*, 2012). La actividad cerebral de esta enzima ha sido muy utilizada como biomarcador de neurotoxicidad después de la exposición a plaguicidas OP tanto en peces marinos (Oliveira, *et al.*, 2007; Martínez-Morcillo *et al.*, 2019) como de agua dulce (Guimarães *et al.*, 2007; Mdegela *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2018). Los cambios en la actividad de esta enzima, después de la exposición a un contaminante, pueden ayudar a explicar algunas alteraciones

en los peces, ya que, el desarrollo de muchas actividades fisiológicas como la capacidad locomotora, evasión de depredadores, orientación, localización de presas, entre otros, dependen de la actividad de AChE (Bradbury *et al.*, 2008).

2.1.3. Peces dulceacuícolas como organismos de ensayo

Los peces son ampliamente utilizados en estudios ecotoxicológicos para evaluar efectos tóxicos (histopatológicos, genotóxicos, citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, entre otros), debido a su sensibilidad a las alteraciones ambientales y su capacidad de metabolizar y bioacumular contaminantes (Schlenk, 2005; Schlenk *et al.*, 2008). Por esta razón, han sido utilizados como modelos experimentales para determinar toxicidad mediante bioensayos agudos y crónicos. Además del estudio de contaminantes específicos, han sido empleados para monitorear las actividades antropogénicas, incluidos los desechos industriales, agrícolas y urbanos, y evaluar los efectos adversos sobre las poblaciones de la vida acuática.

2.1.3.1. *Cnesterodon decemmaculatus* como modelo experimental

Cnesterodon decemmaculatus (Jenyns, 1842), conocida por su nombre común “madrecita de agua” (Figura 32), es una especie autóctona sudamericana de amplia distribución, encontrándose en Argentina, sur de Brasil y Uruguay (Ringuelet *et al.*, 1967). Habita en estanques de poca profundidad, aguas estancadas, charcas y zanjas, así como en arroyos, lagos, lagunas y ríos. Es una especie bentopelágica de agua dulce o salobre (dureza 0,5 – 3,9 CaCO₃ × L⁻¹) que se encuentra en climas subtropicales, y presenta tolerancia a variaciones de salinidad y temperatura (Gómez, 1996).

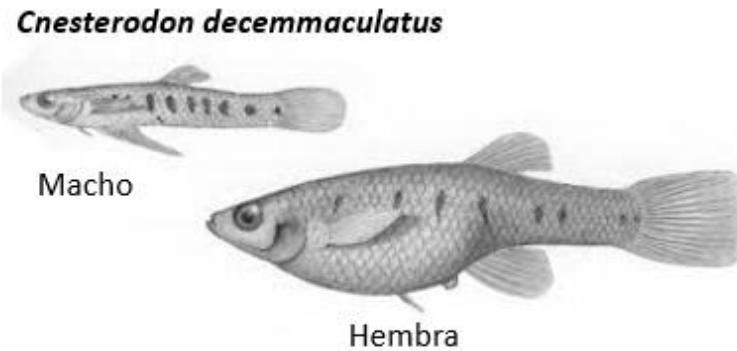


Figura 32. Ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus*. Tomado y modificado de Menni (2004).

C. decemmaculatus, es una especie de fecundación interna, ovovivípara. Presenta un marcado dimorfismo sexual, ya que los machos presentan una modificación de la aleta anal conocido como gonopodio, empleado para fecundar a la hembra (Figura 32). En la Tabla 12 se describe su clasificación taxonómica.

Tabla 12. Clasificación taxonómica de *Cnesterodon decemmaculatus*

Clasificación taxonómica	
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Osteichthyes
Clase	Actinopterygii
Orden	Cyprinodontiformes
Familia	Poeciliidae
Genero	<i>Cnesterodon</i>
Especie	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Jenyns, 1842)

Esta especie ha sido empleada como modelo experimental en estudios de ecotoxicología debido a que presenta un gran éxito en su estrategia reproductiva, un rápido crecimiento, y corta vida generacional, características que la hacen una especie óptima y fácil de mantener en laboratorio (Molero y Pisanó, 1987; de la Torre *et al.*, 2007). *C. decemmaculatus* ha sido utilizada por diferentes investigadores en estudios de biomonitoring ambiental (Vidal *et al.*, 2018; Ossana *et al.*, 2016, 2019; Baudou *et al.*, 2019), y ha sido propuesta por el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM) como una especie apropiada como

organismo de ensayo para la determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce (IRAM 29112-2008).

Se ha informado la inhibición de AChE en *C. decemmaculatus* por exposición a metales pesados, plaguicidas y muestras ambientales (de la Torre *et al.*, 2002; Bonifacio *et al.*, 2016; Baudou *et al.*, 2019). Ha sido previamente reportada la inhibición por exposición a concentraciones ambientales de clorpirifós (Bernal-Rey *et al.*, 2017). Por otro lado, aunque dada su estructura química no se preveía que el PMG pudiera inhibir en forma directa a esta enzima, algunos autores han determinado una disminución de su actividad después de la exposición *in vivo* tanto a formulados de glifosato (Vera-Candioti *et al.*, 2013; Bonifacio *et al.*, 2016) como al principio activo (Menéndez-Helman *et al.*, 2012; Bernal-Rey *et al.*, 2020).

2.1.3.2. *Gambusia affinis* como modelo experimental

Gambusia affinis es conocida como el “pez mosquito”, autóctono del sudeste de Estados Unidos y norte de México. A inicios del siglo XX se empezó a introducir en diferentes países como agentes de control biológico, para reducir los mosquitos ya que, este pez se alimenta de las larvas. En Argentina fueron introducidos 20.000 ejemplares tanto de *G. affinis* como *G. holbrooki* en 1943 (Matthews y Brand, 2005). En la Figura 33 se muestran ejemplares de hembra y macho de *Gambusia affinis* y en la Tabla 13 se describe su clasificación taxonómica.

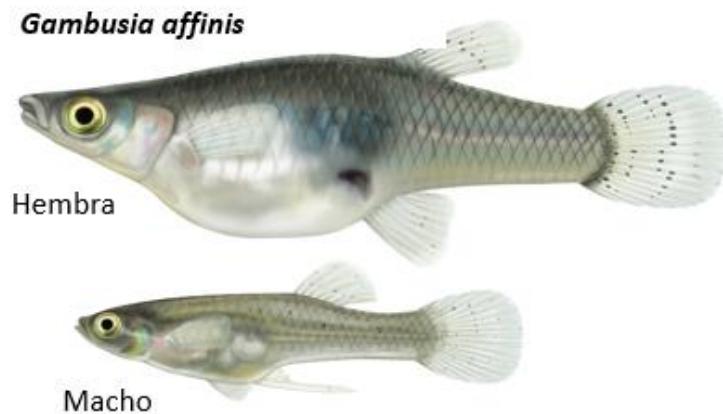


Figura 33. Ejemplares de *Gambusia affinis*

Tabla 13. Clasificación taxonómica de *Gambusia affinis*.

Clasificación taxonómica	
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Osteichthyes
Clase	Actinopterygii
Orden	Cyprinodontiformes
Familia	Poeciliidae
Genero	<i>Gambusia</i>
Especie	<i>Gambusia affinis</i> (Baird y Girard, 1853)

Al igual que *C. decemmaculatus*, esta especie presenta dimorfismo sexual con la presencia de gonopodio en los machos. Es una especie ovovivípara, con alta tasa de fecundidad. Posee una dieta amplia carnívora-insectívora y presenta una gran dispersión en ausencia de barreras (Langerhans *et al.*, 2004; Gido y Franssen, 2007; Alemadi y Jenkins, 2008). Se reproduce de forma rápida lo que le permite dominar hábitats en los que ha sido introducida y presenta una alta tolerancia en aguas con bajos niveles de oxígeno, alta salinidad y elevadas temperaturas (Matthews y Brand, 2005).

G. affinis integra la lista de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo, catalogadas por el Programa Mundial sobre especies invasoras (Global Invasive Species Programme GISP) (Lowe *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta las características biológicas de *G. affinis*, varias de las cuales la hacen altamente competitiva y la definen como una especie invasora dominante en la mayoría de los hábitats, su amplia distribución en cuerpos de agua de Argentina (Nieva *et al.*, 2010) y su cercanía taxonómica con *C. decemmaculatus*, se seleccionó a esta especie para evaluar la susceptibilidad diferencial de la exposición a CPF.

2.2. Hipótesis

- Los plaguicidas presentes en los cuerpos de agua superficiales aledaños a zonas con actividad agropecuaria causan efectos neurotóxicos en especies acuáticas como los peces de agua dulce.

2.3. Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de la exposición a concentraciones subletales de clorpirifós (CPF) y glifosato (PMG) sobre la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y su capacidad de recuperación en *Cnesterodon decemmaculatus*.
- Comparar la susceptibilidad diferencial de la exposición a CPF *in vivo* sobre la actividad de AChE en *C. decemmaculatus* y *Gambusia affinis*.
- Evaluar la sensibilidad diferencial de la AChE presente en homogenatos de *C. decemmaculatus* y *G. affinis* a la exposición *in vitro* a clorpirifós-oxón.
- Analizar si la exposición *in vitro* a PMG y AMPA produce efectos sobre la actividad de AChE en *C. decemmaculatus*.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Organismos de ensayo.

Se obtuvieron ejemplares adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Gambusia affinis* de un acuario comercial que colectaba ejemplares de estas especies en arroyos de la Provincia

de Buenos Aires, y con quien se coordinaba, previamente a los bioensayos, la fecha en que serían capturados. Los peces fueron trasladados al Bioterio de Animales No Tradicionales (BANT) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA), donde se aclimataron por un período de 10 días en acuarios de vidrio con agua de red declorada en condiciones de temperatura y luz controladas ($23,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12L:12O), aireación constante, y alimentación con comida comercial (Tetra Fin® en pellets finamente molidos).

2.4.2. Diseño experimental.

2.4.2.1. Efectos neurotóxicos y capacidad de recuperación en *C. decemmaculatus*. Bioensayos agudos de exposición a concentraciones subletales de clorpirifós y glifosato.

Para evaluar el efecto de la exposición a concentraciones subletales de CPF y PMG sobre la actividad de AChE y su capacidad de recuperación en *C. decemmaculatus* se llevó adelante un bioensayo de exposición semiestático agudo de 96 h. El mismo fue realizado siguiendo las pautas descriptas en la norma IRAM descriptas para determinación de la toxicidad de sustancias en peces de agua dulce (IRAM, 29112-2008).

Se seleccionaron peces ambos sexos del stock de talla homogénea (aproximadamente 2,5 cm de longitud total y se los distribuyó al azar en recipientes de material plástico inerte de polipropileno. Se colocaron 5 ejemplares por recipiente en 500 mL de agua moderadamente dura (AMD), manteniendo una relación biomasa/volumen de $1 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$. El AMD fue preparado según protocolo US EPA (1993): 96 mg $\text{NaHCO}_3 \times \text{L}^{-1}$, 60 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \times \text{L}^{-1}$, 60 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \times \text{L}^{-1}$, 4 mg $\text{KCl} \times \text{L}^{-1}$; pH: 7,4 – 7,8; dureza: 80 -100 mg $\text{CaCO}_3 \times \text{L}^{-1}$; alcalinidad 60-70 mg $\text{CaCO}_3 \times \text{L}^{-1}$. Este medio ya se encuentra estandarizado para bioensayos con esta especie según Norma IRAM 29112-2008. Los animales fueron aclimatados en AMD durante 48 h en cámara de incubación bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y fotoperíodo (12L:12O).

Transcurridas las 48 h de aclimatación, los peces fueron expuestos durante 96 h a dos concentraciones subletales de cada plaguicida ensayado (CPF y PMG), o mantenidos en condiciones control. Para evaluar los efectos sobre la actividad de AChE y su capacidad de

recuperación se expuso un grupo de animales durante 96 h (E, n=9-10 por tratamiento), un segundo grupo se mantuvo luego de la exposición aguda en condiciones control (AMD) durante las siguientes 96 h (R1, n=4-5 por tratamiento) y el tercer grupo (R2, n=4-5 por tratamiento) se mantuvo en condiciones control durante 144 h post exposición. En todos los grupos (E, R1 y R2) se contó con los tratamientos de exposición a los plaguicidas y con un control (mantenido en AMD desde el inicio del ensayo). En la Figura 34 se describe el diseño experimental utilizado.

Teniendo en cuenta las concentraciones cuantificadas en el cuerpo de agua del Cuartel V, Partido de Moreno y las concentraciones ambientales más altas reportadas en bibliografía, se decidió realizar bioensayos de exposición a concentraciones subletales de 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y de 1 y 10 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$. Las concentraciones que se utilizaron en este trabajo de investigación se encontraron por debajo de las concentraciones máximas reportadas para cuerpos de agua: 10,8 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para CPF y 10,9 mg $\times \text{L}^{-1}$ para PMG (Marino y Ronco 2005; Ronco, 2011). Asimismo, se encuentran por debajo de los valores de concentración letal 50 (CL₅₀) determinados previamente para *C. decemmaculatus*: 105,3 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Paracampo *et al.*, 2014), 75 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$; y > 225 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$ (Carriquiriborde, 2010).

Las soluciones de CPF se prepararon por dilución a partir de una solución madre de 1000 mg CPF $\times \text{L}^{-1}$ preparada en etanol (la concentración final de etanol en los medios de exposición fue de 1×10^{-4} - 5×10^{-4} %). En trabajos previos se descartó en esta especie que la concentración más alta de etanol utilizada en los medios experimentales cause algún efecto sobre la actividad de esta enzima luego de exposiciones agudas (Bernal-Rey *et al.*, 2017; Bernal-Rey, 2018 -ver anexo 6-). Las soluciones de PMG (1 y 10 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$) se prepararon por dilución con AMD de una solución madre de 200 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$ preparada en agua Milli-Q, la cual se sónico para garantizar su total disolución. En todos los medios experimentales se verificó el pH de tal manera que coincidiera con los valores del control. En los medios experimentales de mayor concentración de PMG fue necesario ajustar el pH con NaOH 4 M, ya que resultaba modificado debido a la característica ácida de la molécula.

Los recipientes fueron parcialmente cubiertos para minimizar la evaporación y evitar el escape de ejemplares. Transcurridas las 48 h de exposición, y cada 48 h durante el período de recuperación en los grupos R1 y R2, se procedió a la completa renovación de los medios, para mantener así las concentraciones constantes durante el tiempo del bioensayo.

Además, en todos los medios experimentales, tanto para los tratamientos con plaguicidas como para los controles, se tomó una alícuota de la solución al inicio, a las 48 h (previo y post recambio), y a las 96 h (tiempo final), las cuales fueron conservadas a -20°C para la posterior determinación de la concentración de los plaguicidas. Los animales fueron alimentados durante el período de aclimatación, previo a la exposición, y cada 48 h previo al recambio de medios en los grupos R1 y R2 luego de las 96 h de exposición.

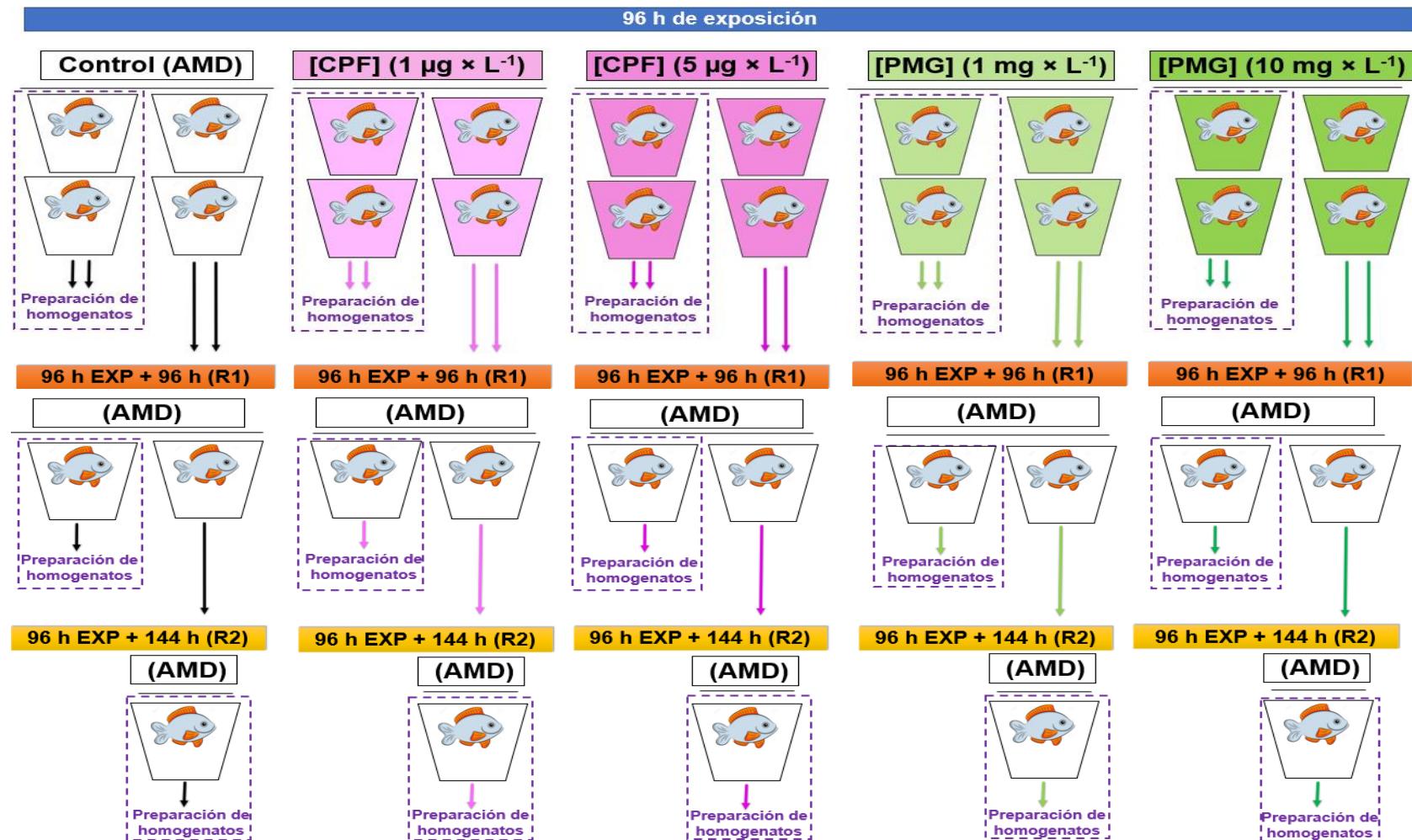


Figura 34. Diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de la exposición a CPF y PMG sobre la actividad de AChE y la capacidad de recuperación después de la exposición a CPF y PMG.

En cada caso, luego del período de exposición o de exposición y recuperación (en los grupos que contaron con dicho período), se prepararon homogenatos de la fracción corporal anterior de los ejemplares (ver sección 2.4.3) para la determinación de la actividad de AChE.

2.4.2.2. Bioensayos agudos de exposición a concentraciones subletales de clorpirifós para evaluar comparativamente la diferencia de susceptibilidad de *C. decemmaculatus* y *G. affinis*.

Para evaluar y comparar la diferencia de susceptibilidad de *C. decemmaculatus* y *G. affinis* a la exposición a concentraciones subletales de CPF, se realizó un bioensayo de exposición semiestático agudo de 96 h durante la misma estación (verano), siguiendo el protocolo (aclimatación, preparación de soluciones, renovación de medios, etc.) descripto en el apartado 2.4.2.1. y utilizando las mismas concentraciones de CPF (1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$). En la Figura 35 se describe el diseño experimental utilizado.

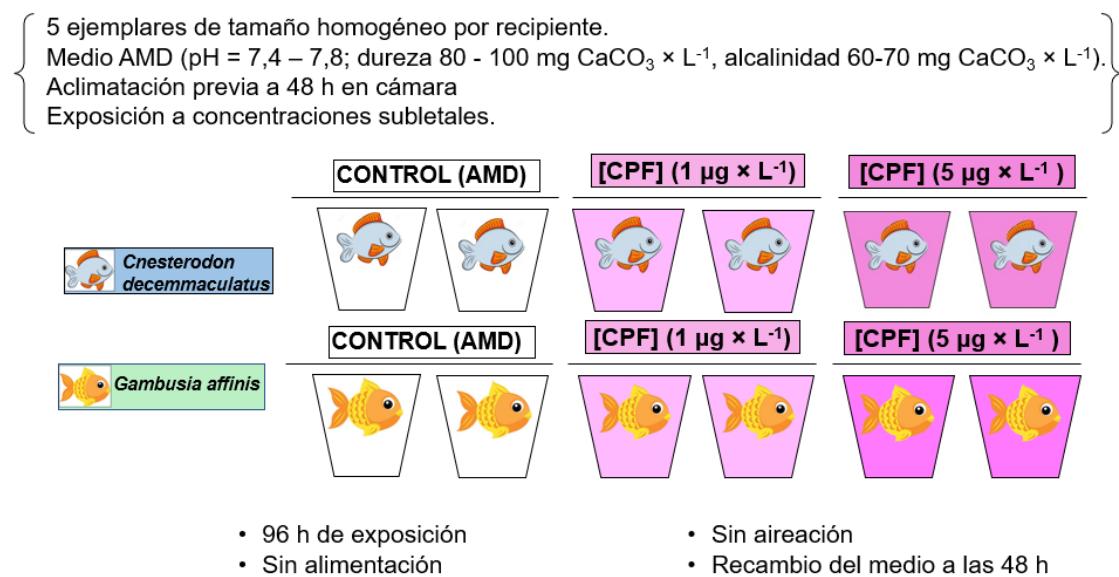


Figura 35. Diseño experimental para evaluar comparativamente la diferencia de susceptibilidad de *C. decemmaculatus* y *G. affinis* expuestos a concentraciones subletales de CPF.

2.4.2.3 Ensayos *in vitro*: Co-incubación de homogenatos de *C. decemmaculatus* y *G. affinis* con clorpirifós oxón.

Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar si existe una diferencia en la sensibilidad de AChE a la exposición a CPF-oxón entre *C. decemmaculatus* y *G. affinis*. Los ensayos se realizaron con CPF-oxón debido a que es el metabolito activo del CPF que inhibe a la enzima AChE.

Se utilizaron alícuotas de homogenatos de la fracción corporal anterior de peces control (organismos que no fueron expuestos). Para las co-incubaciones con CPF-oxón se ensayaron concentraciones finales de 0, 10, 50, 100 y 200 nM. Estas concentraciones se prepararon a partir de una solución de 800 nM en 0,05% de etanol en buffer fosfato 0,1 M, pH 8. Se alcanzó un volumen final de 40 µL, añadiendo 23,3 µL de homogenatos control y diferentes cantidades de buffer fosfato y de solución madre de CPF-oxón para obtener las concentraciones utilizadas. El tiempo de co-incubación fue de 15 min de acuerdo con la metodología utilizada por otros autores (Boone y Chambers, 1997, Carr *et al.* 1997).

Para este ensayo se utilizaron dos controles, el primero añadiendo 23,3 µL de homogenato, y 16,7 µL de buffer fosfato y el segundo añadiendo buffer fosfato y etanol, de tal forma que se obtuviera en el volumen final la concentración de etanol más alta utilizada (0,0125% de etanol). Una vez finalizado el tiempo de co-incubación se determinó la actividad de AChE. En la

Figura 36 se describe el diseño experimental del ensayo *in vitro*.

Diseño experimental. Ensayo *in vitro* Clorpirifós-oxón (CPF-oxón)

Soluciones:

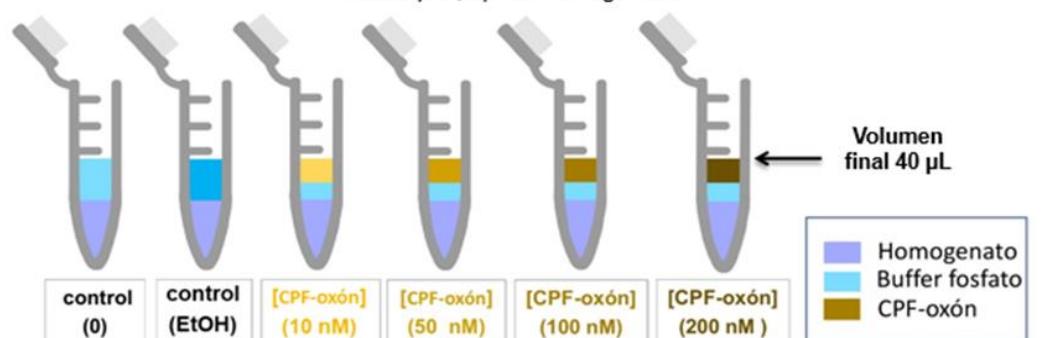


Homogenato
Sección anterior.
Animales no expuestos

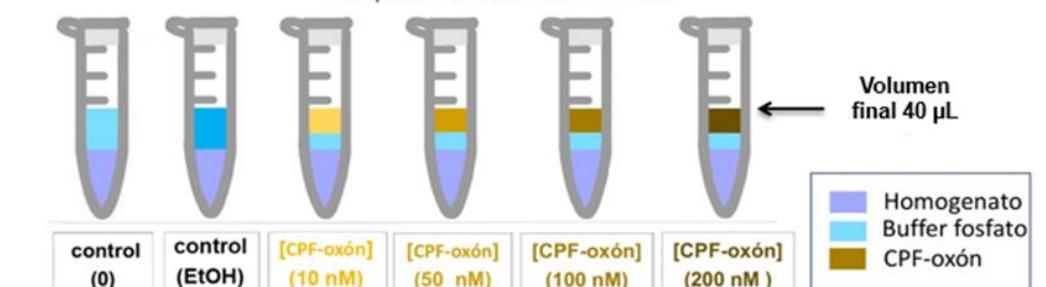


Solución madre en Buffer
fosfato 0,1M (pH=8)

Se tomaron diferentes volúmenes de buffer fosfato, de la solución madre y 23,3 μ L de homogenato



Tiempo de incubación de 15 minutos



Una vez finalizado el tiempo de
incubación se midió la actividad de AChE
por espectrofotometría UV



Figura 36. Diseño experimental del ensayo *in vitro* para evaluar los efectos de CPF-oxón sobre la actividad de AChE de *C. decemmaculatus* y *G. affinis*.

2.4.2.4. Ensayos *in vitro*: Co-incubación de homogenatos de *C. decemmaculatus* con glifosato y ácido aminometilfosfónico.

Se realizaron ensayos *in vitro* con PMG y AMPA, el metabolito del PMG, para evaluar si alguna de estas moléculas inhibe a la enzima AChE a partir de un mecanismo de inhibición directo.

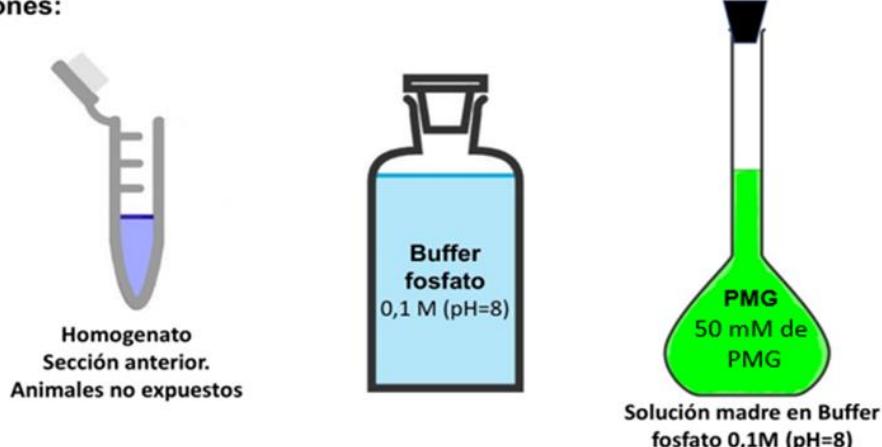
Se preparó una solución madre de PMG 50 mM en buffer fosfato, que fue sonicada para garantizar su total disolución. Teniendo en cuenta el comportamiento ácido base del PMG que, a altas concentraciones como las ensayadas, puede cambiar drásticamente el pH y alterar la estabilidad de la enzima y su actividad, se ajustó el pH de la solución con NaOH a pH 8. De esta manera, puede evaluarse el efecto de la molécula más allá de su característica ácida.

Se utilizaron alícuotas de homogenatos de la fracción corporal anterior de peces control. Se tomaron alícuotas de 45 µL de homogenato de la fracción anterior de los animales (n=4). En todos los casos se alcanzó un volumen final de 75 µL por adición de buffer fosfato en tubos eppendorf de 1,5 mL y alícuotas de la solución madre de PMG, obteniéndose las siguientes concentraciones finales de PMG: 0, 2,5; 5; 7,5; 10 y 20 mM. Después de 1 h de co-incubación se determinó la actividad de AChE. En la Figura 37 se describe el diseño experimental utilizado.

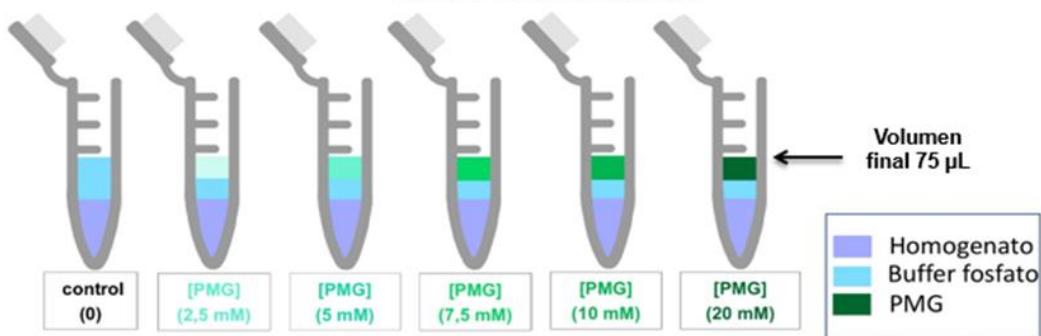
Para la selección del tiempo de co-incubación se analizaron las diferentes concentraciones de PMG utilizadas a diferentes tiempos (30 min a 1 h) y se eligió el mayor tiempo de co-incubación en el que la disminución de la actividad de la enzima en condición control fuera menor a un 10%.

Diseño experimental. Ensayo *in vitro* a glifosato (PMG)

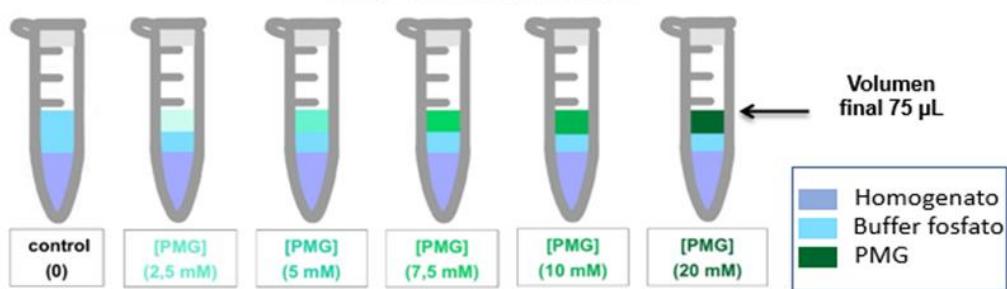
Soluciones:



Se tomaron diferentes volúmenes de buffer fosfato, de la solución madre y 45 μ L de homogenato



Tiempo de incubación de 1 hora



Una vez finalizado el tiempo de incubación se midió la actividad de AChE por espectrofotometría UV



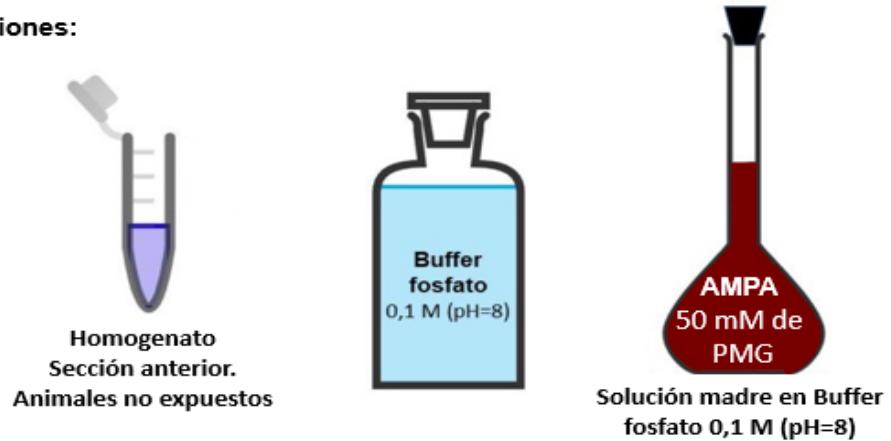
Figura 37. Diseño experimental del ensayo *in vitro* para evaluar los efectos de PMG sobre la actividad de AChE de *C. decemmaculatus*.

Por otro lado, se preparó una solución madre de AMPA 50 mM en buffer fosfato, que fue sonicada para garantizar su total disolución. Se ajustó el pH de la solución a 8 con NaOH para evaluar el efecto del metabolito sobre la enzima AChE más allá de su característica ácida.

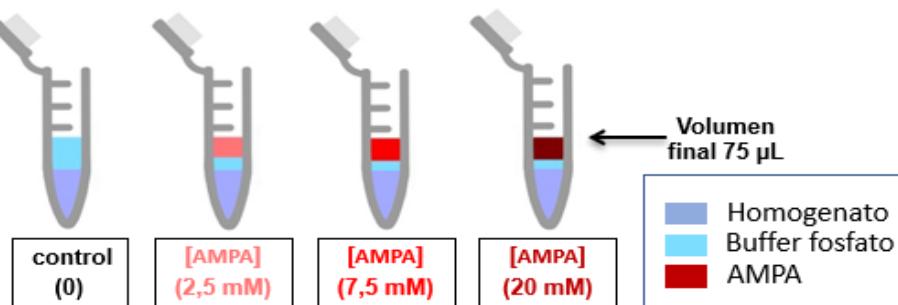
En este caso también se utilizaron alícuotas de 45 μ L de homogenato de la fracción anterior (n=4) de *C. decemmaculatus* de organismos control y el volumen final fue de 75 μ L por adición de buffer fosfato y alícuotas de la solución madre del metabolito. Las concentraciones finales ensayadas fueron: 0, 2,5; 7,5 y 20 mM de AMPA. Después de 15, 30 y 60 min de co-incubación se determinó la actividad de AChE. En la Figura 38 se describe el diseño experimental utilizado.

Diseño experimental. Ensayo *in vitro* AMPA

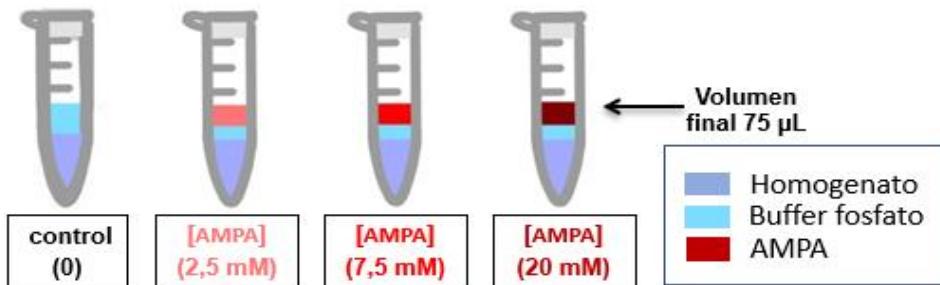
Soluciones:



Se tomaron diferentes volúmenes de buffer fosfato, de la solución madre y 45 μ L de homogenato



Tiempo de incubación de 15, 30 y 60 minutos



Una vez finalizado el tiempo de incubación se midió la actividad de AChE por espectrofotometría UV



Figura 38. Diseño experimental del ensayo *in vitro* para evaluar los efectos de AMPA sobre la actividad de AChE de *C. decemmaculatus*.

2.4.3. Preparación de homogenatos

Trascurridas las 96 h de exposición, 96 o 144 h de recuperación, según el caso, se procedió a la disección y preparación de homogenatos para la determinación del contenido de proteínas y la actividad de acetilcolinesterasa (AChE).

Los peces fueron anestesiados por inmersión en un baño de agua-hielo por 2-3 min. Luego de alcanzar la inmovilidad, se colocaron sobre una plancha de parafina refrigerada y se los sacrificó por seccionamiento de la médula con tijera de punta fina. Posteriormente, se colocaron los ejemplares en una caja de Petri con Parafilm, fueron sexados, se midió la longitud total (L_T) con un calibre digital ($\pm 0,1$ cm) y se los pesó (P) en una balanza analítica ($\pm 0,01$ mg). A continuación, se hizo una incisión a la altura del opérculo de dorsal a ventral, quedando separada la fracción anterior que corresponde a la cabeza, desde el opérculo hasta la boca (Figura 39). Las fracciones anteriores fueron pesadas en balanza analítica ($\pm 0,01$ mg) para la preparación de los homogenatos y la determinación enzimática.

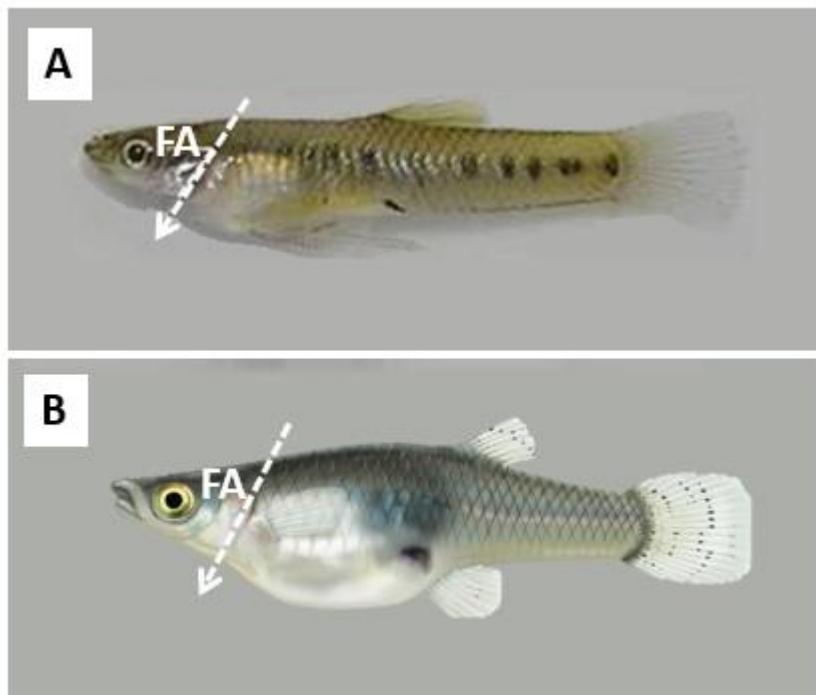


Figura 39. Disección realizada para obtener la fracción anterior de los ejemplares **A:** *Cnesterodon decemmaculatus*; **B:** *Gambusia affinis*. **FA:** Fracción anterior (incluye branquias, opérculo y cabeza completa).

Los homogenatos para ambas especies se prepararon en buffer K_2HPO_4 0,1 M, pH = 8 El volumen del buffer fue calculado aplicando un factor (F) de 25 al peso del tejido:

$$V_{\text{buffer}} (\text{mL}) = P_{\text{tejido}} (\text{g}) \times F \quad [2.1]$$

La fracción anterior de los peces se homogeneizó con un equipo Decalab, rotor teflón-vidrio (20 golpes a 3000 rpm). Los homogenatos fueron luego centrifugados a 10000 g a 4°C durante 15 min en una en microcentrífuga (HERMLE Z 216 MK); se separó el sobrenadante y se descartó el pellet.

Todos los homogenatos se guardaron en tubos eppendorf de 1,5 mL en freezer a -20°C para la determinación de la actividad de AChE en un lapso no superior a dos semanas.

A partir del peso y la longitud de los peces se determinó el factor de condición de Fulton (K). Este factor permite conocer y comparar el estado nutricional o la “condición” de un pez o una población, basándose en que los peces de mayor peso, a una determinada longitud, presentan una mejor una mejor condición (Froese, 2006).

El factor de condición (K) fue calculado como:

$$K = \frac{P_c \times 100}{L_T^3} \quad [2.2]$$

donde P_c es el peso corporal del pez (g), y L_T su longitud total (cm).

2.4.4. Determinaciones analíticas

2.4.4.1. Actividad enzimática: Acetilcolinesterasa (AChE)

La determinación de la actividad de AChE se realizó a partir del método de Ellman *et al.* (1961). Este método se basa en la aparición de tiocolina como producto de la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina, catalizada por la enzima AChE. La tiocolina en presencia del DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) genera el compuesto 5-tio-2-nitrobenzonato que puede ser medido espectrofotométricamente a $\lambda = 412$ nm durante 2 min a intervalos de 8 seg (Figura 40).

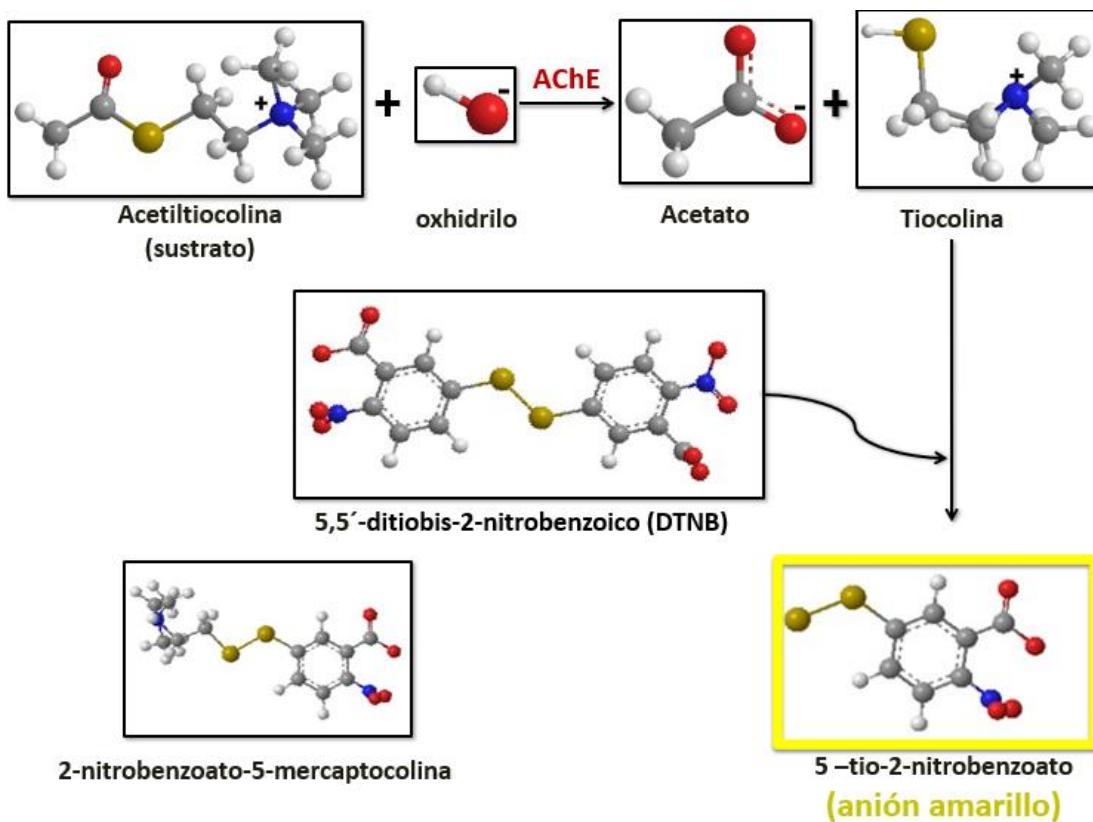


Figura 40. Determinación de la actividad de la enzima AChE medida a través de la degradación de acetiltiocolina a tiocolina, y la reacción de ésta con el DTNB.

Este parámetro se determinó sobre alícuotas de 10 μL del sobrenadante de homogenatos de la fracción anterior incubadas con 3 mL de buffer fosfato, 100 μL DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico) 0,01 M (en buffer fosfato pH 7 y 0,17 mM de NaHCO_3) y 20 μL del sustrato (ioduro de acetiltiocolina, 0,075 M). Se utilizó como blanco: 3 mL de buffer fosfato (pH 8) 0,1 M, 10 μL de homogenato, 100 μL DTNB, sin sustrato. Todas las muestras se midieron por triplicado. Se graficaron los valores de absorbancia obtenidos versus tiempo (min) obteniéndose una función lineal, y a partir de estas rectas se promediaron las pendientes de las réplicas para cada muestra. La actividad enzimática A se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A = \frac{m \times f_{\text{dil}} \times 1000}{l \times e} \quad [2.3]$$

donde m es la pendiente promedio de la recta, f_{dil} es el factor de dilución de ($V_{\text{TOTAL}}/V_{\text{homogenato}}$), 1000 es el factor de conversión de mM a μM , l es el paso óptico de la

celda (cm) y ε es el coeficiente de extinción molar del ioduro de acetiltiocolina ($13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

A partir de esta ecuación, A queda expresada en $\text{nmoles de sustrato hidrolizado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$.

2.4.4.2. Determinación de la concentración de proteínas tisulares

El contenido de proteínas se valoró cuantitativamente mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Este es un método que se basa en la detección del color azul que se genera al reaccionar el complejo proteína-cobre con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta coloración presenta una absorbancia máxima a $\lambda = 650 \text{ nm}$.

Se preparó una curva patrón utilizando como estándar albúmina bovina (BSA) con las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de albumina en 200 μL de agua Milli-Q, a partir de una solución stock de $1 \text{ mg BSA} \times \text{mL}^{-1}$. Se colocaron 8 μL del homogenato de la fracción anterior llevándose a 200 μL de volumen con agua mili-Q y 1 mL del Reactivo C (50 mL Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 M: 1 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5% en tartrato de Na 1%) en tubo de hemólisis. Se agitó en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se agregó 100 μL de Reactivo E (reactivo de *Folin-Ciocalteu* diluido 1:1 con agua mili Q), nuevamente se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min (volumen final 1300 μL).

La lectura de absorbancia se realizó en celda de plástico de 1 cm de paso óptico a $\lambda = 650 \text{ nm}$. Para determinar la concentración de proteínas por volumen de homogenato, se interpoló la absorbancia obtenida en la curva patrón de BSA expresándose el resultado como $\text{mg de proteínas} \times (\text{mL homogenato})^{-1}$.

2.4.4.3. Determinación de las concentraciones de plaguicidas en los medios de ensayo

Las concentraciones analíticas de CPF y PMG se determinaron en colaboración con un laboratorio de toxicología en Colombia. Se utilizó un equipo cromatógrafo líquido de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF) Agilent, con un detector

Agilent QTOF 6530 equipado con ionizador dual ESI. La metodología utilizada se describió en el apartado 1.4.5. del Capítulo 1.

2.4.5. Expresión de los resultados y análisis estadístico

La actividad enzimática registrada fue referida al contenido proteico de la muestra y se expresó y se graficó como actividad específica (AE), a partir de la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{A}{PT} \quad [2.4]$$

donde PT es el contenido de proteínas totales ($\text{mg proteínas} \times \text{mL}^{-1}$). La AE queda expresada como $(U) = \text{nmoles de sustrato hidrolizado} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Proteínas})^{-1}$. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se calculó la media y el error estándar (ESM) de la AE de AChE, el contenido de proteínas totales y los parámetros morfométricos para los ensayos *in vivo* e *in vitro* tanto del grupo control como de los diferentes tratamientos (CPF, CPF-oxón, PMG).

Para el análisis de los niveles basales de la actividad de la enzima AChE de los controles diferenciado por sexo, tanto en *C. decemmaculatus* como *G. affinis*, se aplicó el test de Fisher para el estudio de homocedasticidad y se utilizó el test t Student para el análisis de las medias.

Para el análisis de la actividad de AChE en los bioensayos *in vivo* se empleó la prueba de ANOVA de 2 factores, seguido de un post test de Tukey para comparaciones múltiples. En el bioensayo donde se estudiaron los efectos sobre la actividad de AChE y la capacidad de recuperación de ésta, los factores que se analizaron fueron el tiempo de recuperación y las concentraciones de plaguicidas ensayadas. En el bioensayo donde se evaluó la diferencia de susceptibilidad entre especies, los factores analizados fueron las concentraciones ensayadas y las especies.

El contenido de proteínas totales y los parámetros morfométricos de todos los bioensayos fueron analizados empleando la prueba de Shapiro-Wilk y el test de Levene para el estudio

de normalidad y de la homocedasticidad. Para la evaluación de las comparaciones múltiples de la media se utilizó el post test de Tukey. Para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad y homocedasticidad se aplicó el test Kruskal Wallis y el post test Dunns.

En los ensayos *in vitro* con CPF-oxón y PMG utilizando homogenatos de *C. decemmaculatus* y *G. affinis* se evaluó la actividad específica promedio de AChE. A partir de la realización de la prueba de ANOVA de 2 factores se analizaron las diferencias entre las concentraciones utilizadas y las diferencias entre las especies a partir de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Además, en los ensayos *in vitro* se calculó la concentración correspondiente al 50% de inhibición (CI₅₀) a partir de la curva dosis-respuesta aplicando la ecuación "log(inhibidor) vs. Respuesta normalizada – pendiente variable" (GraphPad Prism software 6,0).

El nivel de significancia para aceptar las hipótesis mediante los test utilizados fue de $\alpha=0,05$ en todos los casos. Para el análisis de ANOVA de dos factores se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism software 6,0 y para los demás análisis se utilizó el programa OriginPro software 9.0.

2.4.6. Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico, y las soluciones fueron preparadas con agua Milli-Q.

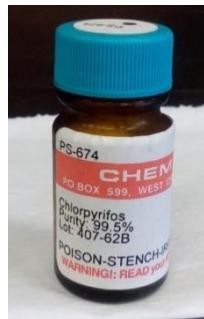
El ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SHBD6835V, CAS 69-78-3), la Albumina Sérica Bovina (BSA) (A7906, CAS 9048-46-8), el ioduro de acetiltiocolina (C₇H₁₆NOSI) (A5751-56, CAS 1866-15-5) utilizados son marca Sigma.

El reactivo Folin- Ciocalteau (17874-16) es marca Anedra.

Plaguicidas

El CPF y el CPF-oxón utilizados fueron adquiridos en Chem Service. En la Tabla 14 y Tabla 15 se describen las características de ambos productos.

Tabla 14. Características generales del clorpirifós.



Clorpirifós	
Nombre	(O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato),
CAS	2921-88-2
Pureza	99,5%
Lote	407-62B
Almacenaje	2-8°C

Tabla 15. Características generales del clorpirifós oxón.



Clorpirifós oxón	
Nombre	dietil (3,5,6-tricloropridin-2-il) fosfato
CAS	5598-15-2
Pureza	98,8%
Lote	555411
Almacenaje	0 - 6°C

El PMG y el AMPA utilizados son marca Sigma. En la Tabla 16 y 17 se describen las características de ambos productos.

Tabla 16. Características generales del glifosato.



Glifosato	
Nombre	(N-(fosfonometil)glicina)
CAS	1071-83-6
Pureza	95%
Lote	23H3668
Almacenaje	A temperatura ambiente

Tabla 17. Características generales del AMPA



AMPA	
Nombre	Ácido aminometilfosfónico
CAS	1066-51-9
Pureza	99%
Lote	2367913
Almacenaje	A temperatura ambiente

2.5. Resultados

2.5.1. Caracterización de los niveles basales de acetilcolinesterasa en los organismos de ensayo.

Se determinaron los niveles basales de la actividad de la enzima AChE en ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Gambusia affinis*, durante la misma temporada (verano). En la Tabla 18 se detallan los valores obtenidos para un grupo de animales de cada especie diferenciado por sexo.

Tabla 18. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_c) y Factor de condición (K)), actividad de la enzima AChE (expresada como unidades de actividad específicas, U) y contenido de proteínas totales en homogenados de la fracción anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Gambusia affinis* no sometidos a exposición. Los valores se expresan como media \pm ESM. Los asteriscos indican diferencias significativas de AChE entre especies para cada sexo. n=número de réplicas biológicas.

Especie	Sexo	n	L_T (cm)	P_c (mg)	AChE (U)	K	Proteínas Totales (mg \times (g de tejido húmedo) $^{-1}$)
<i>C. decemmaculatus</i>	Hembras	10	2,51 \pm 0,06	76 \pm 6	270 \pm 9	0,63 \pm 0,05	60 \pm 1
	Machos	8	2,26 \pm 0,08	76 \pm 9	253 \pm 5	0,64 \pm 0,02	60 \pm 2
<i>G. affinis</i>	Hembras	10	2,6 \pm 0,1	151 \pm 30	206 \pm 13*	0,78 \pm 0,06	48 \pm 5
	Machos	7	2,5 \pm 0,2	91 \pm 12	174 \pm 21*	0,66 \pm 0,07	47 \pm 4

Aunque, se evidencia en las dos especies una mayor actividad de la enzima AChE en hembras con respecto a machos, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Por otra parte, al comparar entre especies para cada sexo, los niveles basales de AChE fueron mayores en *C. decemmaculatus* con respecto a *G. affinis*, tanto en hembras como en machos.

2.5.2. Evaluación de efectos y capacidad de recuperación de la actividad de acetilcolinesterasa en *C. decemmaculatus* después de la exposición *in vivo* a glifosato y a clorpirifós.

En este apartado se analizó el efecto sobre la actividad de AChE de la exposición *in vivo* a las concentraciones subletales seleccionadas para glifosato (1 y 10 mg PMG \times L $^{-1}$) y clorpirifós (1 y 5 μ g CPF \times L $^{-1}$), y la capacidad de recuperación.

2.5.2.1. Actividad de acetilcolinesterasa en *C. decemmaculatus* después de la exposición a glifosato. Evaluación de efectos y capacidad de recuperación.

La actividad específica (AE) de AChE en el grupo control utilizado durante las 96 h de exposición (E) fue de 264 \pm 11 U. La talla promedio de los peces de los diferentes tratamientos utilizados en este grupo (E) se encontró entre 2,44 y 2,49 cm. Los valores de talla y el contenido de proteínas totales no presentaron diferencias significativas con

respecto al control. En cambio, en el peso se observó una disminución en los diferentes tratamientos, obteniendo diferencias significativas ($p<0,01$) en el tratamiento de $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de PMG con respecto al grupo control. Lo mismo se observó en el factor de condición, en el cual se determinó una disminución significativa ($p<0,01$) en el tratamiento de mayor concentración.

En el grupo de menor tiempo de recuperación (R1), se observó una talla homogénea en el rango de 2,25 - 2,28 cm en los peces utilizados en los diferentes tratamientos. La AE de AChE del grupo control de R1 fue de 263 ± 3 U. Al analizar los valores morfométricos y el contenido de proteínas totales no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control. En el grupo de mayor tiempo de recuperación (R2), el valor promedio de la AE de AChE del control fue de 259 ± 5 U. El rango de la talla promedio de los peces fue de 2,05 – 2,22 cm. Al igual que en el grupo R1 no se obtuvieron diferencias significativas al comparar los valores morfométricos ni en el contenido de proteínas totales entre los tratamientos. En la Tabla 19 se detallan los valores de los parámetros tanto del grupo de exposición (E) como de los grupos de exposición y recuperación (R1 y R2). No se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre el grupo control y los grupos expuestos, no superando en ningún caso el 10%.

Tabla 19. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_c), Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 96 h de exposición (E) a 1 y $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$, 96 h de recuperación (R1) o 144 h de recuperación (R2). Los valores se expresan como media \pm ESM. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control correspondiente; ** $p<0,01$. n=número de réplicas biológicas.

Grupo	n	[PMG] ($\text{mg} \times \text{L}^{-1}$)	L_T (cm)	P_c (mg)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido}$ húmedo) $^{-1}$)
Grupo (E)	9	0	$2,44 \pm 0,03$	91 ± 6	$0,63 \pm 0,03$	61 ± 2
	9	1	$2,49 \pm 0,02$	84 ± 4	$0,54 \pm 0,03$	65 ± 3
	9	10	$2,44 \pm 0,03$	$69 \pm 3^{**}$	$0,47 \pm 0,02^{**}$	61 ± 2
Grupo (R1)	4	0	$2,25 \pm 0,07$	64 ± 10	$0,55 \pm 0,05$	59 ± 2
	5	1	$2,27 \pm 0,06$	65 ± 7	$0,55 \pm 0,04$	52 ± 2
	5	10	$2,28 \pm 0,04$	67 ± 7	$0,56 \pm 0,03$	55 ± 2
Grupo (R2)	5	0	$2,05 \pm 0,07$	55 ± 6	$0,65 \pm 0,09$	59 ± 1
	5	1	$2,20 \pm 0,03$	59 ± 4	$0,56 \pm 0,06$	54 ± 2
	5	10	$2,22 \pm 0,04$	58 ± 2	$0,53 \pm 0,01$	53 ± 3

En la Figura 41 se grafica la actividad de AChE después de la exposición aguda (96 h) a PMG y a las 96 h (R1) y a las 144 h (R2) de recuperación post exposición.

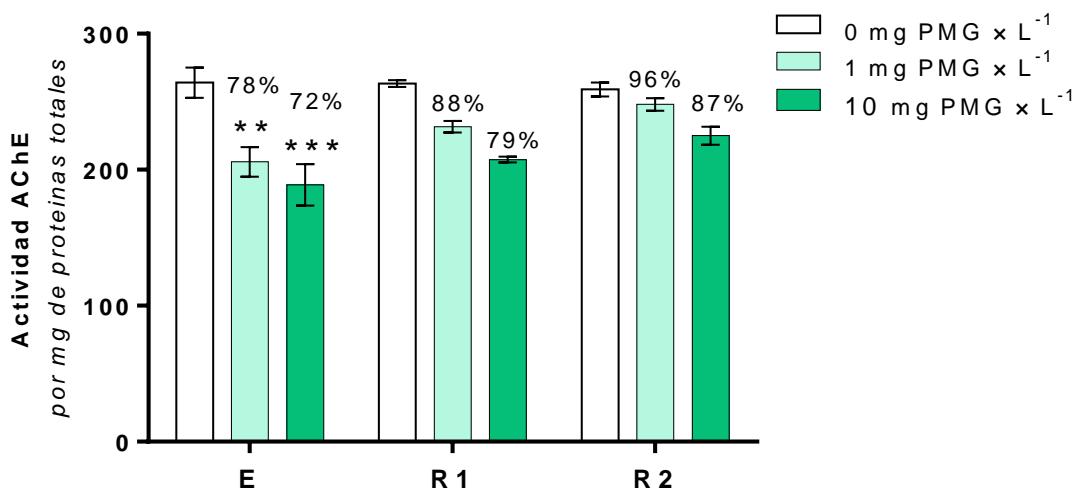


Figura 41. Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenatos de la fracción anterior de *Cnesterodon decemmaculatus* después de ser expuestos durante 96 h (E); luego de 96 h de recuperación (R1) o de 144 h de recuperación (R2) post-exposición. Los valores se expresan como media \pm ESM. Los resultados se grafican como valor absoluto y a la vez se informan en porcentaje relativizados al respectivo grupo control (100%); los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al mismo ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$.

La exposición aguda (96 h) a PMG produjo una disminución estadísticamente significativa de la actividad de AChE del 22% ($p<0,01$) y 28% ($p<0,001$) para 1 y 10 mg $\text{PMG} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente, con respecto al control. La disminución de la actividad evidenció un perfil concentración dependiente: menor actividad de la enzima a medida que aumenta la concentración de PMG. Por otro lado, la actividad de AChE aumentó a medida que aumentaba el tiempo de recuperación. Para R1 se observó una disminución del 12% y 21%, para 1 y 10 mg $\text{PMG} \times \text{L}^{-1}$ con respecto al grupo control. La actividad se recuperó prácticamente por completo para R2, disminuyendo el 4% y 13% para 1 y 10 mg $\text{PMG} \times \text{L}^{-1}$ en comparación al grupo control.

Al analizar el factor concentración, el ANOVA de dos factores evidenció diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) para 1 y 10 mg $\text{PMG} \times \text{L}^{-1}$ con respecto al control. Por su parte, en relación con el factor tiempo de recuperación, el ANOVA de dos factores determinó diferencias estadísticamente significativas para R2 ($p<0,05$) respecto al grupo E, demostrando la potencial reversibilidad en el efecto sobre la actividad de AChE después de la exposición a PMG (ver anexo 7).

Las concentraciones analíticas de PMG determinadas en los medios del bioensayo en el tiempo inicial, previo al recambio, post recambio y a tiempo final se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentraciones analíticas de PMG determinadas en alícuotas de los medios de los bioensayos recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final (96 h). Los valores se expresan como media \pm ESM. Las concentraciones fueron determinadas por cromatografía iónica de aniones (el método de medición tiene un error del 2%).

Concentraciones de plaguicidas en los medios de ensayo					
	Nominal	Inicio de la exposición	48 h (previo recambio)	48 h (post recambio)	96 h
[PMG] (mg \times L $^{-1}$)	1	1,0	0,8	1,1	0,9
	10	9,9	8,0	9,8	8,2

Para las concentraciones de PMG se observó luego de 48 h, desde tiempo inicial hasta el recambio y desde el recambio hasta tiempo final, una disminución promedio del 19% para 1 mg \times L $^{-1}$ y del 18% para 10 mg \times L $^{-1}$.

2.5.2.2. Actividad de acetilcolinesterasa en *C. decemmaculatus* después de la exposición a clorpirifós. Evaluación de efectos y capacidad de recuperación.

La AE de AChE del control de los grupos E, R1 y R2 fue de 264 \pm 11, 263 \pm 3 y 259 \pm 5 U, respectivamente. La talla promedio de los peces utilizados en el grupo de 96 h de exposición sin recuperación (E) se encontró en el rango de 2,44 - 2,47 cm, en R1 fue de 2,25 - 2,28 cm y en el grupo R2 fue de 2,05 - 2,23 cm. Al comparar los parámetros morfométricos y el factor de condición en cada grupo entre el control y los tratamientos se observó en E diferencias significativas en el factor de condición ($p<0,05$) y las proteínas totales ($p<0,01$) para el grupo expuesto a la mayor concentración de CPF. En la Tabla 21 se detallan los valores de los parámetros morfométricos y el contenido de proteínas totales para los distintos grupos experimentales. La mortalidad del grupo control y los grupos expuestos no superó en ningún caso el 10%.

Tabla 21. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (Pc), Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de 96 h de exposición (E) a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$, 96 h de recuperación (R1) o 144 h de recuperación (R2). Los valores se expresan como media \pm ESM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control correspondiente; * $p<0,05$ y ** $p<0,01$. n=número de réplicas biológicas.

Grupo	n	[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	L_T (cm)	Pc (mg)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
Grupo (E)	9	0	2,44 \pm 0,03	91 \pm 6	0,63 \pm 0,03	61 \pm 2
	9	1	2,43 \pm 0,06	82 \pm 9	0,55 \pm 0,04	53 \pm 4
	10	5	2,47 \pm 0,05	74 \pm 6	0,49 \pm 0,04*	42 \pm 2**
Grupo (R1)	4	0	2,25 \pm 0,07	64 \pm 10	0,55 \pm 0,05	59 \pm 2
	4	1	2,28 \pm 0,05	65 \pm 7	0,53 \pm 0,04	60 \pm 2
	5	5	2,28 \pm 0,01	67 \pm 7	0,53 \pm 0,03	54 \pm 3
Grupo (R2)	5	0	2,05 \pm 0,07	55 \pm 6	0,65 \pm 0,09	59 \pm 1
	4	1	2,20 \pm 0,07	59 \pm 1	0,56 \pm 0,04	55 \pm 3
	5	5	2,23 \pm 0,04	57 \pm 2	0,56 \pm 0,03	59 \pm 3

En la Figura 42 se grafica la actividad de AChE después de la exposición aguda (96 h) a CPF, y luego de 96 o 144 h de recuperación.

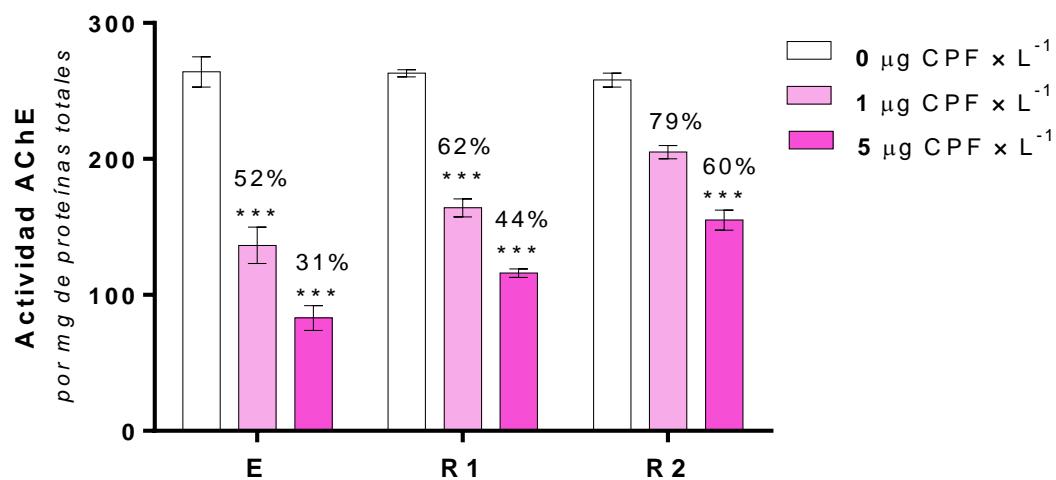


Figura 42. Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenados de la fracción anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* después de ser expuestos durante 96 h (E), luego de 96 h de recuperación (R1) o de 144 h de recuperación (R2) post-exposición. Los valores se expresan como media \pm ESM. Los resultados se grafican como valor absoluto y a la vez se informan en porcentaje relativizados al respectivo grupo control (100%); los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al mismo *** $p<0,001$.

La exposición a CPF produjo una disminución de la actividad de AChE, aún mayor que la observada para la exposición a PMG. La diferencia con el grupo control respectivo resultó estadísticamente significativa y concentración dependiente: 48% ($p<0,001$) para la concentración de $1 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y 69% ($p<0,001$) para $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Se verificó en un ensayo previo la ausencia del efecto del solvente para la concentración de etanol más alta utilizada.

A las 96 h de recuperación (R1) después de la exposición a 1 y $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ se observó una inhibición de la actividad de AChE del 38% ($p<0,001$) y 56% ($p<0,001$), respectivamente. Transcurridas las 144 h de recuperación (R2) se obtuvo una inhibición del 21% y 40% siendo estadísticamente significativa para la mayor concentración ($p<0,001$) con respecto al control.

El ANOVA de dos factores mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p<0,001$) al analizar la concentración de CPF como factor. Por otro lado, en relación con el factor tiempo de recuperación, se determinaron diferencias estadísticamente significativas tanto para R1 ($p<0,05$) como para R2 ($p<0,001$), evidenciando una recuperación de la actividad.

Las concentraciones analíticas de CPF en los medios del bioensayo a tiempo inicial, previo al recambio, post recambio y a tiempo final se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22 Concentraciones analíticas de CPF determinadas en alícuotas de los medios de los bioensayos recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final (96 h). Las concentraciones fueron determinadas por cromatografía líquida de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF). Los valores se expresan como media \pm ESM.

Concentraciones de plaguicidas en los medios de ensayo					
	Nominal	Inicio de la exposición	48 h (previo recambio)	48 h (post recambio)	96 h
[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	1	$1,08 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,01$
	5	$4,92 \pm 0,01$	$4,88 \pm 0,02$	$4,99 \pm 0,01$	$4,80 \pm 0,01$

Las concentraciones de CPF resultaron similares a las nominales, no observándose una disminución relevante para ninguno de los tratamientos durante el bioensayo.

2.5.3. Evaluación de la susceptibilidad diferencial de la exposición *in vivo* a clorpirimifós (CPF) sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *C. decemmaculatus* y *G. affinis*.

Para comparar los efectos obtenidos en la exposición *in vivo* de *C. decemmaculatus* a CPF con otra especie de la misma familia (Poeciliidae), se realizó un bioensayo semiestático agudo utilizando como organismo de ensayo a *G. affinis*.

La talla promedio de los ejemplares de *G. affinis* expuestos a CPF se encontró en el rango 2,45 - 2,46 cm. En la Tabla 23 se detallan los parámetros morfométricos y el contenido de proteínas de los organismos utilizados en este bioensayo. Al comparar estos parámetros entre el control y los tratamientos con CPF no se obtuvieron diferencias significativas ($p>0,05$). En cuanto a la mortalidad en el grupo control fue del 10% y en los grupos expuestos del 10 - 20%.

Tabla 23. Parámetros morfométricos (Longitud total (LT), Peso corporal (Pc), Factor de condición (K)) y contenido de proteínas totales de los ejemplares de *Gambusia affinis* del grupo control y de los grupos expuestos (1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$). Los valores se expresan como media \pm ESM. n=número de réplicas biológicas.

n	[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	LT (cm)	PC (mg)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
8	0	2,46 \pm 0,02	117 \pm 10	0,79 \pm 0,07	49 \pm 5
9	1	2,45 \pm 0,09	114 \pm 12	0,77 \pm 0,05	58 \pm 4
8	5	2,45 \pm 0,04	102 \pm 8	0,71 \pm 0,06	58 \pm 5

La AE de AChE para *G. affinis* en el grupo control fue de 177 ± 19 U, mientras que para *C. decemmaculatus* fue de 264 ± 11 U. Dado que después de la exposición a CPF se observó en el tratamiento de mayor concentración una disminución estadísticamente significativa en las proteínas en *C. decemmaculatus* (apartado 2.5.2.2) y considerando que este parámetro se utiliza para calcular la actividad específica de la enzima, se utilizaron en este caso dos formas de expresión de la actividad. Para determinar el efecto general sobre la actividad de AChE, sin descartar el efecto inespecífico, se determinó para las dos especies la actividad de AChE relativizada por mg de proteína y además por mg de tejido. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 43 como porcentajes relativos con respecto a los controles.

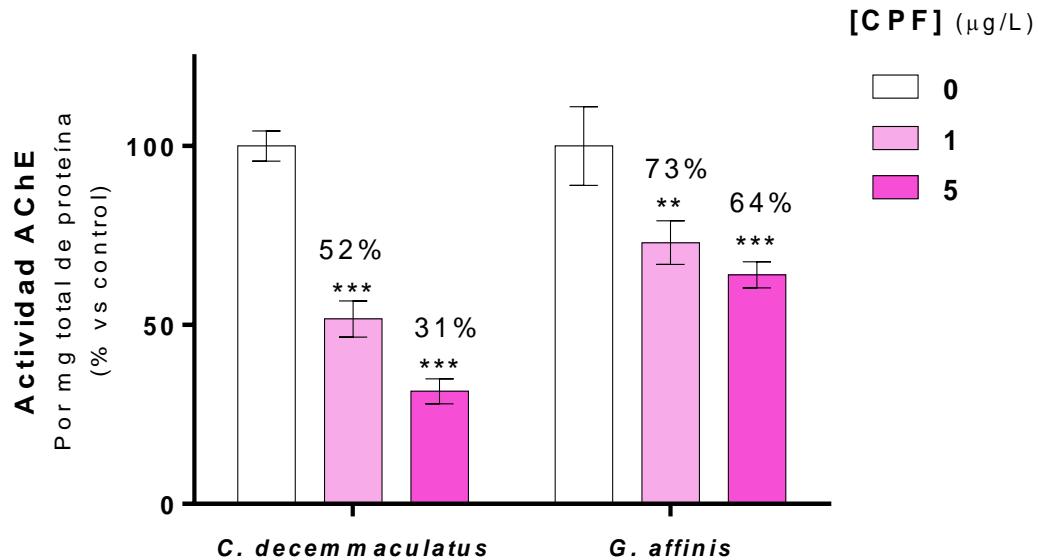
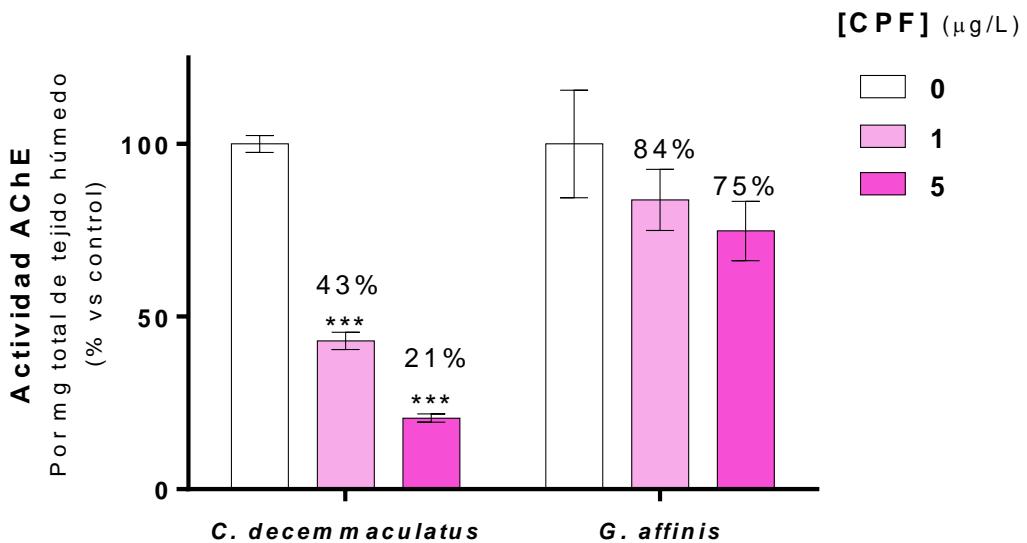
A**B**

Figura 43. Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenatos de la fracción anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Gambusia affinis* después de ser expuestos durante 96 h a 1 y 5 µg CPF x L⁻¹. **A:** Porcentaje de actividad específica de AChE respecto al grupo control **B:** Porcentaje de actividad (expresada por mg de tejido húmedo) de AChE respecto al grupo control. Los valores se expresan como media ± ESM (n=8-10). Los resultados son relativizados al respectivo grupo control (100%) y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al mismo (**p<0,01 y ***p<0,001).

La inhibición de la actividad de AChE resultó estadísticamente significativa y concentración dependiente para las dos especies en estudio. *C. decemmaculatus* presentó una mayor inhibición de la actividad de AChE que *G. affinis*. Al expresarse la actividad por mg de proteína se obtuvo una inhibición del 48% ($p<0,001$) y 27% ($p<0,01$) para la concentración de 1 μg CPF \times L $^{-1}$ y del 69% ($p<0,001$) y 36% ($p<0,001$) para 5 μg CPF \times L $^{-1}$ con respecto al grupo control, para *C. decemmaculatus* y *G. affinis*, respectivamente. (Figura 43A). Al expresarse la actividad de AChE por mg de tejido húmedo (Figura 43B) la inhibición fue aún mayor para *C. decemmaculatus*, 57% ($p<0,001$) y 79% ($p<0,001$), con respecto a *G. affinis*, 16% y 25%, para 1 y 5 μg CPF \times L $^{-1}$, respectivamente.

Al analizar el factor especie, el ANOVA de dos factores evidenció diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) entre *G. affinis* y *C. decemmaculatus*, tanto al expresar la actividad por mg de proteína como por mg de tejido húmedo (ver anexo 8).

2.5.4. Evaluación de la sensibilidad diferencial de la enzima acetilcolinesterasa al clorpirifós oxón en *C. decemmaculatus* y *G. affinis*. Ensayos *in vitro*.

Para evaluar si las diferencias observadas entre las especies en el bioensayo de exposición *in vivo* a CPF se deben a una diferencia de sensibilidad de la enzima *per se* al contaminante, se analizó la sensibilidad de la AChE *in vitro* al metabolito activo CPF-oxón. En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos.

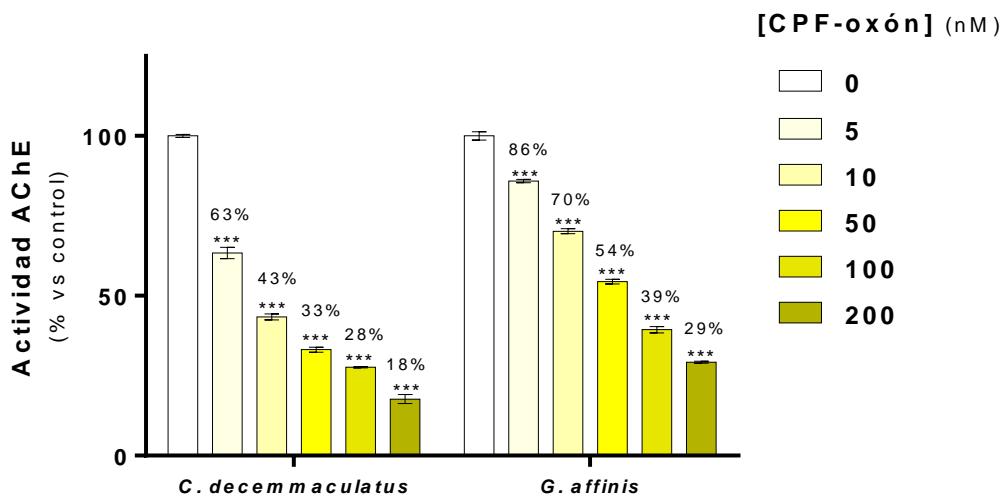


Figura 44. Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenatos de la fracción anterior de ejemplares control de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Gambusia affinis* después de la exposición *in vitro* a clorpirifós oxón (5, 10, 50, 100, 200 nM) durante 15 min. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=4$) como porcentaje relativo al respectivo grupo control (100%), y los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al mismo ($***p<0.001$).

En el caso de la exposición a CPF-oxón se observó, como era esperable, un perfil de inhibición de la actividad de AChE dependiente de la concentración para ambas especies. El rango de inhibición fue de 37% a 82% para la enzima presente en homogenatos de *C. decemmaculatus* y de 14% a 71% para *G. affinis*. Las diferencias entre las dos especies resultaron estadísticamente significativas ($p<0.001$). La IC_{50} para la exposición *in vitro* a CPF-oxón en estas condiciones fue de 10,2 nM ($R^2=0,9170$) para *C. decemmaculatus* y 54,2 nM ($R^2=0,9746$) para *G. affinis*.

2.5.5. Análisis de mecanismos de inhibición. Efectos de la exposición *in vitro* a glifosato y a ácido aminometilfosfónico sobre la actividad de acetilcolinesterasa en homogenatos de *C. decemmaculatus*.

Dado que se desconoce si existe un mecanismo de inhibición directo del PMG sobre la actividad de AChE que determine la disminución de la actividad observada *in vivo*, se evaluó el efecto de la exposición de este herbicida *in vitro* sobre la actividad de esta enzima en homogenatos de animales control de *C. decemmaculatus*. No se observaron efectos sobre la actividad de AChE para ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 45).

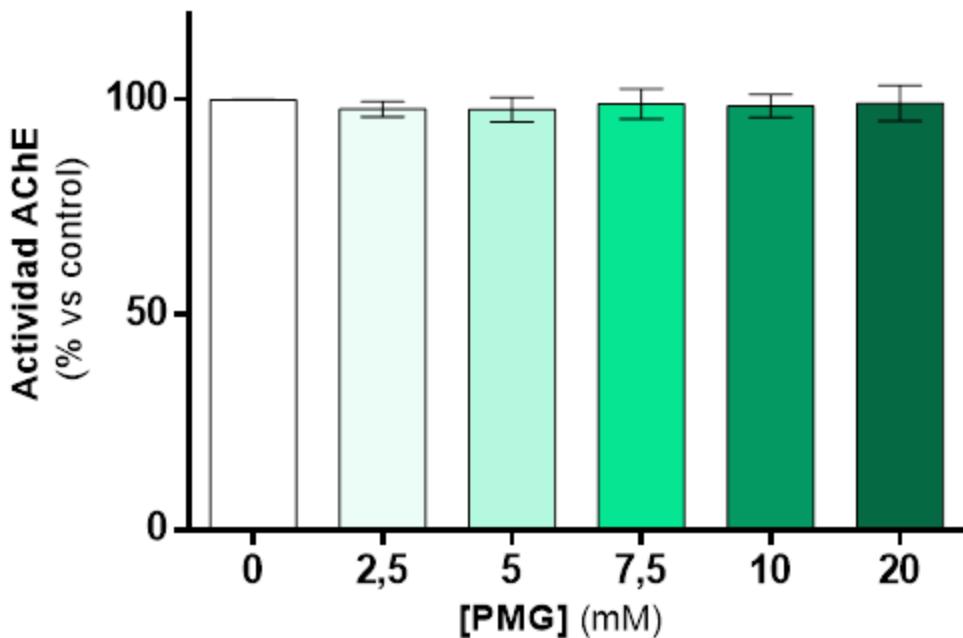


Figura 45. Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenatos de la fracción anterior de ejemplares control de *Cnesterodon decemmaculatus* después de la exposición *in vitro* a glifosato (2,5; 5; 7,5; 10; 20 mM) durante 60 min. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=4) como porcentaje relativo al respectivo grupo control (100%).

Teniendo en cuenta que no se observaron cambios en la actividad de AChE después de la exposición *in vitro* a PMG, se decidió evaluar si existe un mecanismo de inhibición directo del AMPA, metabolito de este herbicida, sobre la actividad de AChE en *C. decemmaculatus*. En la Figura 46 se muestran los resultados obtenidos.

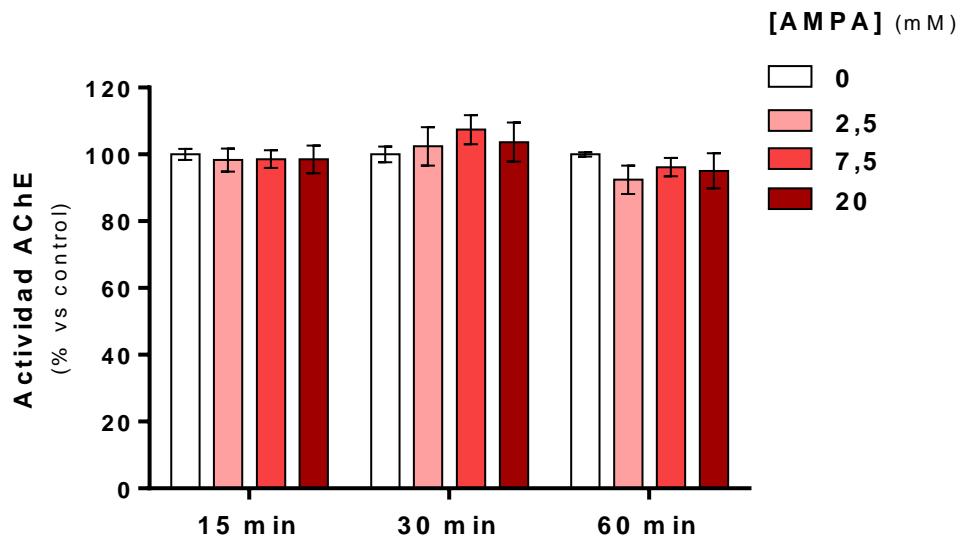


Figura 46. Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenatos de la fracción anterior de ejemplares control de *Cnesterodon decemmaculatus* después de la exposición *in vitro* a AMPA (2,5; 7,5 y 20 mM) durante 15. 30 y 60 min. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=4) como porcentaje relativo al respectivo grupo control (100%).

No se obtuvieron cambios en la actividad de AChE en ninguno de los tiempos de exposición para ninguna de las concentraciones utilizadas.

2.6. Discusión

En este Capítulo se evaluó la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* luego de la exposición a concentraciones ambientales de dos plaguicidas organofosforados ampliamente utilizados en Argentina y en el mundo, PMG y CPF. La actividad de esta enzima ha sido utilizada en varios estudios ecotoxicológicos como marcador de neurotoxicidad (Bradbury *et al.*, 2008; Durieux y Gevenois, 2010).

Se ha descripto que los niveles basales de la actividad de AChE puede cambiar en los peces de acuerdo con el sexo, la talla o la temperatura ambiental (Beauvais *et al.*, 2002, Chandrasekara y Pathiratne, 2007; Durieux y Gevenois, 2010). Sin embargo, los valores de la actividad de AChE basal obtenidos para ejemplares de *C. decemmaculatus* y *Gambusia affinis* de talla homogénea no expuestos a contaminantes, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras, para ninguna de las especies estudiadas.

En cuanto a los niveles promedio de actividad basal de AChE determinados en este estudio, los valores obtenidos resultan semejantes a lo reportado previamente. Menéndez-Helman *et al.* (2015) describió el comportamiento circanual de la actividad de AChE en la fracción anterior de *C. decemmaculatus*. Los valores de los niveles basales de la actividad de AChE obtenidos experimentalmente en esta Tesis durante la estación de verano (264 ± 6 U) fueron similares a los que surgen de las ecuaciones propuestas por Menéndez-Helman *et al.* (2015) teniendo en cuenta la estacionalidad (274 U), y la estacionalidad y la talla de los peces utilizados (242 U). Se han reportado valores más altos en la actividad cerebral de AChE (296 ± 7 U) para *C. decemmaculatus*, colectados de un estanque natural, tomado como sitios de referencia en verano (de la Torre *et al.*, 2005).

La media de los niveles basales de la actividad de AChE en la fracción anterior para *G. affinis* fue de 177 ± 19 U, otros autores han reportado valores un poco más altos de la actividad cerebral AChE para esta especie (233 ± 19 U) (Carr *et al.*, 1997).

En relación con las concentraciones de los plaguicidas organofosforados evaluados en los ensayos de toxicidad (PMG y CPF) se utilizaron concentraciones subletales como se

evidencia a partir de los valores de CL₅₀-96 h que han sido reportados por otros autores para las especies estudiadas. Para *C. decemmaculatus* se han reportado valores de CL₅₀-96 h de 225 mg PMG × L⁻¹ y 75 µg CPF × L⁻¹ (Carriquiriborde, 2010) y de 105,3 µg CPF × L⁻¹ (Paracampo *et al.*, 2014), mientras que para *G. affinis*, la especie que se utilizó a modo de comparación en el bioensayo de CPF, los valores de CL₅₀-96 h encontrados en bibliografía fueron de 520 µg CPF × L⁻¹ (Varó *et al.*, 2000) y 297 µg CPF × L⁻¹ (Deb y Das, 2013).

Aunque el mecanismo de acción del PMG no es inhibir la actividad de AChE, ni era un efecto esperable dada su estructura química, varios estudios han reportado efectos de disminución de la actividad de AChE después de 96 h de exposición *in vivo*, tanto a formulados comerciales como al principio activo (Glusczak *et al.*, 2007; Modesto y Martínez, 2010a; Menéndez-Helman *et al.*, 2012; Sandrini *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2018).

Luego de la exposición aguda (96 h) de *C. decemmaculatus* a PMG se determinó una actividad de AChE del 78% y 72% para 1 y 10 mg PMG × L⁻¹ con respecto al control. A los 4 días (96 h) de recuperación (R1) se observó que la actividad de AChE fue del 88% y 79% y a los 6 días (144 h) (R2) del 96% y 87% para 1 mg PMG × L⁻¹ y 10 mg PMG × L⁻¹, respectivamente, con respecto al grupo control.

El tiempo requerido para la recuperación de la actividad de AChE varía con el tipo de plaguicida y la especie en estudio (Crestani *et al.*, 2007). Algunos autores han informado en peces la recuperación de la actividad de AChE después de la exposición de 96 h a formulados comerciales de glifosato. Cattaneo *et al.* (2011) informaron en *Cyprinus carpio* la recuperación del 100% de la actividad de AChE, incluso el aumento de la actividad con respecto a los controles después de la inhibición por exposición durante 96 h a diferentes concentraciones (0,5; 2,5; 5,0 y 10 mg PMG × L⁻¹) del formulado comercial Roundup.

Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción del CPF como insecticida es inhibir a la enzima AChE, es esperable que produzca efectos de neurotoxicidad en especies no blanco como los peces de agua dulce. Es necesario resaltar que las bajas concentraciones utilizadas son ambientalmente relevantes, ya que se han informado concentraciones de CPF de 10,8 µg × L⁻¹ para cuerpos de agua superficial en áreas agrícolas de la región pampeana (Marino y Ronco, 2005), e incluso en algunas muestras de la subcuenca Las

Catonas analizadas en esta Tesis las concentraciones resultaron cercanas a los $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

En la exposición aguda (96 h) de *C. decemmaculatus* a CPF se observó una actividad de AChE del 52% y 31% con respecto al grupo control, para 1 y $5 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente. A los cuatro días (96 h) y seis días (144 h) de recuperación la actividad fue del 62% y 44% y del 79% y 60% con respecto al control, para los tratamientos de $1 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $5 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Otros autores, también han reportado la inhibición y la recuperación de la actividad cerebral de AChE en peces después de la exposición aguda a CPF. En *G. affinis* se ha informado la recuperación de la actividad cerebral de AChE después de la exposición a $297 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ en un 50% y 100% al cabo de 8 y 22 días, respectivamente (Kavitha y Venkateswara Rao, 2008). En *Oreochromis mossambicus*, se observó una recuperación del 50% a los 9 días luego de la exposición a $26 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Venkateswara Rao *et al.*, 2003). En *Oreochromis niloticus* se reportó una recuperación del 100% 14 días después de una exposición a $0,5 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ durante 48 h, y a los 10 días luego de una exposición de ejemplares sub-adultos a $1 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ durante el mismo tiempo (Chandrasekara y Pathiratne, 2007).

La exposición a PMG y CPF produjo una disminución de la actividad de AChE en la fracción anterior de ejemplares de *C. decemmaculatus* y se evidenció una recuperación en la actividad enzimática luego del período de exposición, lo que indica una potencial reversibilidad de los efectos producidos.

Los resultados muestran una inhibición de la AChE inducida por la exposición aguda a CPF, tanto para *C. decemmaculatus* como para *G. affinis*, en todos los tratamientos (1 y $5 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$). La inhibición varió del 48% al 69% en *C. decemmaculatus* y del 27% al 36% en *G. affinis*. Se obtuvieron diferencias significativas en el grado de inhibición entre las dos especies para cada tratamiento. *C. decemmaculatus* mostró una mayor inhibición de AChE que *G. affinis*. Estos resultados concuerdan con las diferencias de susceptibilidad en base a los valores de toxicidad letal del CPF reportados para ambas especies. Mientras que para *C. decemmaculatus* se han informado valores de CL_{50} de $75 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $105,3 \mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Carriquiriborde, 2010; Paracampo *et al.*, 2014), para

G. affinis se han reportado valores más altos de CL₅₀ de 520 µg CPF × L⁻¹ y 297 µg CPF × L⁻¹ (Varó *et al.*, 2000; Deb y Das, 2013). En este sentido, aunque las dos especies en estudio pertenecen a la misma familia, Poeciliidae, la CL₅₀ de *C. decemmaculatus* es inferior a la de *G. affinis*. Estos datos muestran que la susceptibilidad a CPF para *C. decemmaculatus* es mayor que para *G. affinis*. Esta diferencia es consistente con los resultados obtenidos en los bioensayos de exposición donde la inhibición de la AChE fue mayor en *C. decemmaculatus* que en a *G. affinis*.

En trabajos previos, Carr *et al.* (1997) reportaron la inhibición de la actividad de AChE en peces después de un derrame accidental de CPF que ocasionó la contaminación del sistema acuático por procesos de escorrentía (en concentraciones de CPF desconocidas). Estos autores informaron que distintas especies como *Micropterus salmoides*, *Lepomis macrochirus*, *Notemigonus crysoleucas* presentaron una alta mortalidad ante dicho evento. Sin embargo, no se observó mortalidad en la población de mosquitofish *G. affinis* en el estanque. Esto es concuerda con la caracterización del pez mosquito como una especie muy tolerante a la contaminación ambiental, lo que le otorgaría una mayor ventaja competitiva como especie invasora frente a las especies nativas en los lugares donde ha sido introducida.

En la exposición *in vivo* de *C. decemmaculatus* a CPF se evidenció una disminución significativa en K (factor de condición de Fulton) y las proteínas totales después de la exposición a 5 µg CPF × L⁻¹, y en la exposición a PMG se observó una disminución en el peso y en K en el tratamiento de 10 mg PMG × L⁻¹. En cambio, en los bioensayos con *G. affinis* ninguno de estos parámetros se vio alterado después de la exposición a CPF. El factor de condición es un indicador del estado nutricional y de salud del organismo, y permite evidenciar el efecto de los tóxicos sobre la condición general de los ejemplares expuestos (Schlenk *et al.* 2008). Una disminución en el factor de condición es directamente equivalente a una disminución en las reservas energéticas (Smolders *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por otros autores. Bonifacio *et al.* (2016) informaron la disminución del K en ejemplares de *C. decemmaculatus* después de 6 semanas de exposición a 8,4 nl × L⁻¹ de Clorfox, un formulado comercial de clorpirifós. Este resultado demuestra que las especies de peces más susceptibles, en este caso *C. decemmaculatus*, pueden presentar alteraciones en la

condición general de salud. Asimismo, la disminución en el contenido de proteínas también indica que el contaminante produce efectos inespecíficos.

Teniendo en cuenta que el valor de las proteínas totales fue afectado por la exposición a CPF en *C. decemmaculatus* y que este parámetro es utilizado para calcular la actividad específica de AChE se recalcó la actividad de la enzima por mg de tejido húmedo. Es de destacar que, aun usando esta expresión, la inhibición de AChE fue mayor para *C. decemmaculatus* (57% y 79%) respecto a *G. affinis* (16% y 25%) después de la exposición a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Los datos disponibles para la exposición aguda o crónica de ambas especies de poecílidos a concentraciones bajas de CPF como principio activo son escasos. Venkateswara Rao *et al.* (2005) informaron la inhibición de la actividad cerebral de AChE en ejemplares de *G. affinis*, alteraciones del comportamiento locomotor y también bioacumulación del insecticida en diferentes tejidos del cuerpo después de la exposición a 60 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ durante 20 días. Kavitha y Venkateswara Rao (2008) determinaron en esta especie una inhibición del 82% en la actividad cerebral de AChE y diversas alteraciones en el sistema locomotor después de la exposición durante 96 h a 297 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Bonifacio *et al.* (2016) informaron un aumento significativo de la actividad cerebral de AChE en *C. decemmaculatus* después de la exposición por 6 semanas a soluciones del formulado comercial Clorfox conteniendo 0,2 y 1 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Para explicar este resultado inesperado, sugieren que el cerebro de los individuos puede responder de manera compensatoria aumentando la síntesis de AChE para hacer frente a la inhibición causada por CPF. La exposición a Clorfox también afectó el estado nutricional general de los peces evidenciado en la disminución del factor de condición de Fulton (K), alteró los parámetros de la actividad locomotora, modificó la relación de las enzimas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa y activó los mecanismos antioxidantes. Es de destacar que en esta Tesis se observó un efecto inhibitorio de la actividad de AChE para ambas especies después de 96 h de exposición a concentraciones ambientalmente relevantes, 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$.

En relación a los ensayos de exposición *in vivo*, por último, cabe destacar que tanto el PMG como el CPF resultaron estables en los medios de exposición durante los bioensayos. De esta forma puede asumirse que las diferencias obtenidas entre los

controles y tratamientos sobre el biomarcador estudiado se deben a los efectos ocasionados por los plaguicidas a las concentraciones nominales descriptas.

La diferencia de la toxicidad *in vivo* entre las especies podría deberse a distintos factores. El CPF no es un potente inhibidor de la AChE. La biotransformación del CPF incluye un proceso de desulfuración oxidativa que conduce a la formación de CPF-oxón, el cual ejerce una fuerte inhibición de la AChE. De hecho, se ha demostrado que las diferencias en la desulfuración oxidativa son responsables de las diferencias de toxicidad entre las especies de peces y las etapas de desarrollo (Hamm *et al.*, 1998). Por lo tanto, diferencias en la sensibilidad enzimática de cada especie al metabolito activo podrían explicar los resultados obtenidos. Otra posibilidad, es la existencia de diferencias entre las especies en el metabolismo del contaminante que puedan afectar los niveles de CPF-oxón que alcanzan el cerebro. Existen diferentes procesos que influyen en la distribución de los diferentes compuestos en los organismos y su vida media entre ellos: la absorción, la biotransformación y la excreción. Estos procesos pueden explicar cambios en las concentraciones de contaminantes en los tejidos y, por lo tanto, diferentes efectos entre especies. Por ejemplo, Carr *et al.* (1997) propusieron un papel protector del músculo esquelético de *G. affinis* considerando que la cantidad de músculo esquelético presente en los peces es mucho más grande que la cantidad de cerebro, y también la sensibilidad de la AChE es 20 veces mayor en este tejido. Los autores plantearon la hipótesis de que es posible que una vez que el contaminante ingresa al organismo, el músculo esquelético proporciona sitios alternativos de fosforilación reduciendo así la cantidad disponible de CPF-oxón que podría inhibir la AChE cerebral. Entonces, si la AChE muscular de *G. affinis* presenta un papel protector que no está igualmente presente en *C. decemmaculatus*, esto podría explicar el efecto diferencial en la inhibición de la AChE de la fracción anterior entre especies después de la exposición *in vivo* a CPF.

Para analizar la primera de estas posibilidades, se estudió la sensibilidad de la enzima AChE de estas especies a CPF-oxón. Para ello, se realizaron ensayos de exposición *in vitro* a CPF-oxón en *C. decemmaculatus* y *G. affinis*.

La inhibición de AChE por CPF-oxón (en el rango 5-200 nM) varió de 37% a 82% para *C. decemmaculatus* y de 14% a 71% para *G. affinis*. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en las IC_{50} para la exposición a CPF-oxón (10,2 nM para

C. decemmaculatus y 54,2 nM para *G. affinis*). Estos resultados concuerdan con la existencia de una sensibilidad diferencial de la enzima a CPF-oxón entre ambas especies.

La IC_{50} para la colinesterasa cerebral (ChE) de *G. affinis* expuesta a CPF-oxón fue previamente determinada por otros autores. Boone y Chambers (1997) estimaron una $IC_{50} = 50 \pm 2$ nM y Carr *et al.* (1997) una $IC_{50} = 64 \pm 2$ nM. Estos valores son muy similares a la IC_{50} obtenida en este estudio (54,2 nM). Además, Carr *et al.* (1997) encontraron que la sensibilidad *in vitro* de la AChE cerebral de *G. affinis* por exposición a CPF-oxón es inferior a la de otras especies (*M. salmoides*, *L. macrochirus* y *N. crysoleucas*). Esto sugiere que las diferencias que encontraron en la mortalidad de estas especies después de una exposición ambiental a CPF, se debe principalmente a las diferencias en la sensibilidad de la AChE cerebral a CPF-oxón. En este sentido, a pesar de que *C. decemmaculatus* y *G. affinis* son especies estrechamente relacionadas, la AChE de homogenatos de *G. affinis* mostró una menor sensibilidad al CPF-oxón que la de *C. decemmaculatus*. Por lo tanto, la respuesta diferencial observada en la exposición *in vivo* podría deberse a la mayor sensibilidad a CPF-oxón de la AChE cerebral de *C. decemmaculatus*.

Por otro lado, se realizó un análisis exploratorio para dilucidar si existe un mecanismo de inhibición directo de AChE por la exposición a PMG en *C. decemmaculatus*. Los ensayos *in vitro* de exposición a PMG no mostraron una inhibición de la enzima a las concentraciones estudiadas. Resultados similares fueron reportados en moluscos de la especie *Phyllocaulis soleiformis* (da Silva *et al.*, 2003). Sin embargo, otros autores han reportado la inhibición del 50% de la actividad de AChE en los peces *Jenynsia multidentata* y *Danio rerio* por exposición *in vitro* a 0,62 y 6,67 mM PMG, respectivamente (Sandrini *et al.*, 2013). No obstante, el efecto de inhibición observado por estos autores podría deberse a un cambio de pH en las concentraciones de PMG utilizadas debido a su comportamiento ácido/base que afectan la actividad de la enzima.

Asimismo, se evaluó si existe un mecanismo de inhibición directo del ácido aminometilfosfónico (AMPA), el principal metabolito del glifosato, sobre la actividad de AChE. La exposición a AMPA no produjo inhibición de la actividad de AChE en ninguno de los tiempos de exposición para ninguna de las concentraciones ensayadas en *C. decemmaculatus*. No se encontraron estudios previos en peces que reporten efectos de AMPA sobre AChE en exposiciones *in vitro*. Sin embargo, Kwiatkowska *et al.* (2014) y

Wang *et al.* (2022) han informado una inhibición superior al 80% en eritrocitos humanos incubados durante 1 h con AMPA (0,50 y 5 mM). Estos autores afirman que los resultados posiblemente se deben a una inhibición no competitiva de esta enzima a diferencia del mecanismo descripto para otros compuestos organofosforados.

Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren que los mecanismos involucrados en la disminución de la actividad de AChE en la exposición *in vivo* a PMG serían indirectos. Monserrat *et al.* (2007) han señalado que la exposición a plaguicidas puede generar el aumento de especies reactivas de oxígeno. Cuando las defensas antioxidantes no pueden contrarrestar el aumento de especies reactivas de oxígeno se genera el estrés oxidativo. Diferentes autores han propuesto al estrés oxidativo como una vía inespecífica presente en diferentes escenarios de toxicidad en peces expuestos a plaguicidas (Parvez y Raisuddin, 2005; Monteiro *et al.*, 2006; Kavitha y Venkateswara Rao, 2008, Wang *et al.*, 2022).

2.7. Conclusiones

La actividad de AChE resultó un biomarcador sensible para la exposición a glifosato (PMG) y clorpirifós (CPF) en *C. decemmaculatus*, un teleósteo nativo que se propone como una especie promisoria para bioensayos de toxicidad y estudios de biomonitorio. Los resultados son una contribución ya que son pocos los estudios relacionados con estos contaminantes en concentraciones ambientalmente relevantes como las ensayadas en el presente trabajo.

Aunque el mecanismo de acción del PMG como herbicida no es inhibir a la enzima AChE, los resultados de este trabajo demuestran que la exposición *in vivo* de *C. decemmaculatus*, a este herbicida, causa una disminución de la actividad de la enzima, siendo el efecto dependiente de la concentración. A la vez, pudo determinarse que existe una potencial reversibilidad de los efectos sobre la actividad de AChE, tanto para la exposición a PMG como a CPF.

La inhibición de AChE por exposición *in vivo* a CPF difiere entre *G. affinis* y *C. decemmaculatus*, siendo esta última la especie más susceptible a la exposición a este insecticida OP. Las IC_{50} de la actividad de AChE determinada para la exposición *in vitro*

al metabolito activo clorpirifós oxón (CPF-oxón) mostró una sensibilidad diferencial entre estas dos especies, presentando la enzima de *C. decemmaculatus* mayor sensibilidad que la de *G. affinis*. Los resultados obtenidos son consistentes con la posibilidad de que la diferencia observada entre las dos especies en la exposición *in vivo* pueda deberse a una diferencia de la sensibilidad de la enzima a CPF-oxón.

En cuanto al PMG y su metabolito AMPA, se descartó la existencia de un mecanismo directo de inhibición. Para identificar las posibles causas del efecto sobre la actividad de AChE en *C. decemmaculatus* por exposición *in vivo* a PMG se debe estudiar el metabolismo del contaminante asociado a los mecanismos indirectos involucrados.

Capítulo 3

Capítulo 3. Evaluación de los efectos de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre parámetros de estrés oxidativo en *Cnesterodon decemmaculatus*

3.1. Introducción

3.1.1. Plaguicidas organofosforados y mecanismos de inducción de estrés oxidativo

Los plaguicidas, entre ellos los organofosforados, pueden generar un desbalance de óxido-reducción celular entre la producción de moléculas de alto poder oxidante derivadas del oxígeno (especies reactivas de oxígeno, EROs) y las defensas antioxidantes, con las que cuentan todos los seres vivos. Cuando esta alteración del equilibrio causa daño a macromoléculas debido a la mayor producción de EROs, se considera que el organismo se encuentra en una situación de estrés oxidativo. En este contexto, el daño celular puede ocurrir a partir de la peroxidación lipídica de las membranas celulares, inactivaciones enzimáticas, daño proteico y al ADN (Regoli 2000; Abele *et al.*, 2012).

Las EROs están presentes en todas las células y se originan por diversos procesos: respiración celular, respuesta a la exposición a rayos UV, X y gamma, o a contaminantes ambientales, desarrollo de enfermedades, entre otras causas. Entre éstas se encuentran las especies radicalarias del oxígeno. Estos radicales libres son moléculas o átomos que poseen uno o más electrones desapareados en su orbital externo, son muy inestables debido a que son altamente reactivos. Por esta razón son potencialmente nocivos para los sistemas biológicos (Abele *et al.*, 2012).

La mayoría de los plaguicidas son agentes sintéticos, nuevos para el medio ambiente, por lo que sus efectos en los sistemas biológicos son poco predecibles. Algunos de ellos, como los insecticidas y herbicidas organofosforados, pueden ser inductores de estrés oxidativo (Abele *et al.*, 2012). En la Figura 47, se describen algunos mecanismos de inducción de estrés oxidativo generado por la exposición a insecticidas organofosforados.

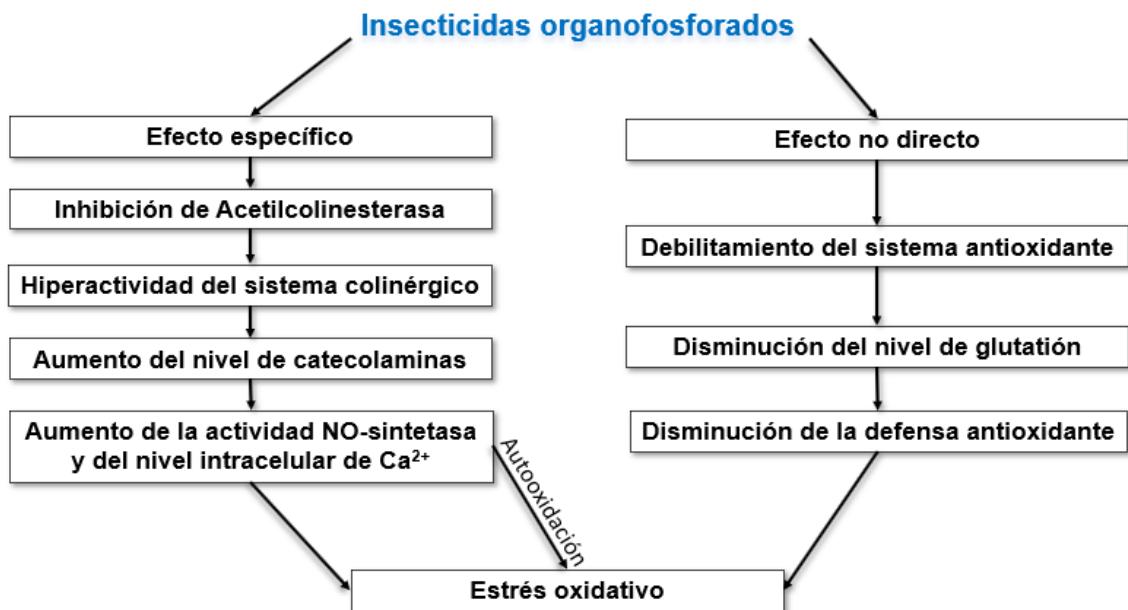


Figura 47. Algunos mecanismos de inducción de estrés oxidativo generado por la exposición a insecticidas organofosforados. Tomado y modificado de Abele *et al.* (2012).

Los insecticidas organofosforados pueden producir diferentes efectos en los organismos expuestos, entre ellos estrés oxidativo. Esto se ha descripto relacionado con el efecto específico de inhibición de AChE (descripto en el apartado 2.1.2 Capítulo 2). La ruptura de la señalización neuronal propicia la entrada intracelular de Ca^{2+} , lo que desencadena la activación de enzimas proteolíticas y de óxido nítrico sintasa, y la generación de radicales libres que pueden desencadenar estrés oxidativo.

Por otro lado, en relación con las vías indirectas del modo de acción, se han determinado que algunos plaguicidas organofosforados al entrar en contacto con las células pueden alterar el equilibrio entre la generación y eliminación de EROs, lo cual puede resultar en estrés oxidativo (Abele *et al.*, 2012). Los herbicidas organofosforados pueden presentar diferentes mecanismos de acción en los organismos. Algunos son capaces de entrar en ciclos redox, lo que puede conducir a un mayor nivel de EROs por autooxidación y causar estrés oxidativo. Otros herbicidas no ingresan directamente en los ciclos redox, sino que inhiben enzimas antioxidantes ejerciendo su mecanismo de acción mediante la inducción del estrés oxidativo, a través de la inhibición de enzimas antioxidantes como la SOD y la CAT (Abele *et al.*, 2012; Lushchak, 2011). Algunos autores han informado la inducción de estrés oxidativo en especies acuáticas no blanco (peces y bivalvos), después de la

exposición a formulados comerciales de glifosato (Glusczak *et al.*, 2007; Iummato *et al.*, 2018). Sin embargo, las vías involucradas en los mecanismos de toxicidad en los escenarios de exposición de peces dulceacuícolas al glifosato como principio activo, y el posible rol del estrés oxidativo en los mismos, aún no se encuentran completamente dilucidadas.

3.1.2. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

- **Anión superóxido (O_2^-).** Formado en reacciones de autoxidación, mediadas por varias enzimas entre ellas, las oxidasa como: xantina oxidasa y la ciclooxigenasa. La principal producción del radical superóxido es en la mitocondria a partir de la cadena respiratoria. Este anión es un nucleófilo activo, y es capaz de reaccionar con moléculas cargadas positivamente (Pisoschi y Pop, 2015).
- **Peróxido de hidrogeno (H_2O_2).** En su mayoría es formado a partir de la dismutación del O_2^- ó por acción de oxidasa a través de la transferencia de dos electrones a oxígeno molecular (Pisoschi y Pop, 2015). Aunque el H_2O_2 no es un radical libre, tiene una gran lipofilicidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el O_2^- . En presencia de metales de transición, para generar EROs más tóxicas como el radical hidroxilo. El H_2O_2 puede degradar los grupos hemo de las proteínas, inactivar enzimas, actuar sobre lípidos y oxidar al ADN (Timbrell, 2009).
- **Radical hidroxilo (OH^-).** Presenta una alta reactividad lo que lo hace muy peligroso y, además, presenta un tiempo de vida muy corto, ya que reacciona inmediatamente (Kunter *et al.*, 2019). Debido a su gran poder oxidante puede actuar sobre el ADN, proteínas y lípidos (Halliwell, 2011). El OH^- puede ser producido principalmente por dos reacciones. La primera es conocida como la reacción de Haber-Weiss, que consiste en la oxidación del anión superóxido y la reducción de un metal de transición como el hierro y la segunda es la reacción de Fenton, que es la descomposición del peróxido de hidrogeno catalizada por un metal de transición (Abele *et al.*, 2012).
- **Radical peroxilo (ROO^-).** Este radical es relativamente estable, con una vida media en el rango de segundos. Estas moléculas pueden difundir desde su sitio de formación y transportar el radical o función oxidante hacia otros sitios blancos. El ROO^-

Se forma a partir de una reacción en tres etapas: la primera es la iniciación donde un radical se forma a partir de una especie química estable no radical, se genera a partir de un agente oxidante que es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de un agente reductor. Y la segunda etapa es la de propagación, donde un radical libre reacciona con una molécula estable, se forma un nuevo radical a partir de la reacción entre el radical obtenido en la primera etapa (iniciación) y una molécula. La última etapa es la finalización, donde dos radicales libres comparten sus electrones desapareados y originan un producto estable (Nonell y Flors, 2016).

- **Oxígeno Singulete ($^1\text{O}_2$).** Existen dos formas de oxígeno singulete: la sigma (Σ) que es el radical libre, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos $2\pi^*$, y la delta (Δ), el cual también posee dos electrones, pero apareados en un solo orbital $2\pi^*$. El $^1\text{O}_2$ se genera por la absorción de energía por la molécula de oxígeno en estado triplete ($^3\text{O}_2$), dando lugar al cambio de spin de uno de los electrones desapareados de los orbitales π^* 2p. El $^1\text{O}_2$ presenta una mayor capacidad oxidante que la del $^3\text{O}_2$ (Nonell y Flors 2016).

3.1.3. Defensas Antioxidantes

Se ha demostrado la existencia de diferentes mecanismos de defensa antioxidante ante el daño oxidativo generado por las EROs. Están formados, entre otros, por sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa -SOD-, catalasa -CAT-, glutatión-S-transferasa -GST) y no enzimáticos (vitaminas C, E y glutatión -GSH-). Estas defensas han sido utilizadas como biomarcadores de contaminación mediados por el estrés oxidativo e inducidas por la exposición a xenobióticos (Sies *et al.*, 2017). En la Figura 48 se muestra un esquema general de algunas de las reacciones involucradas en la neutralización de las EROs.

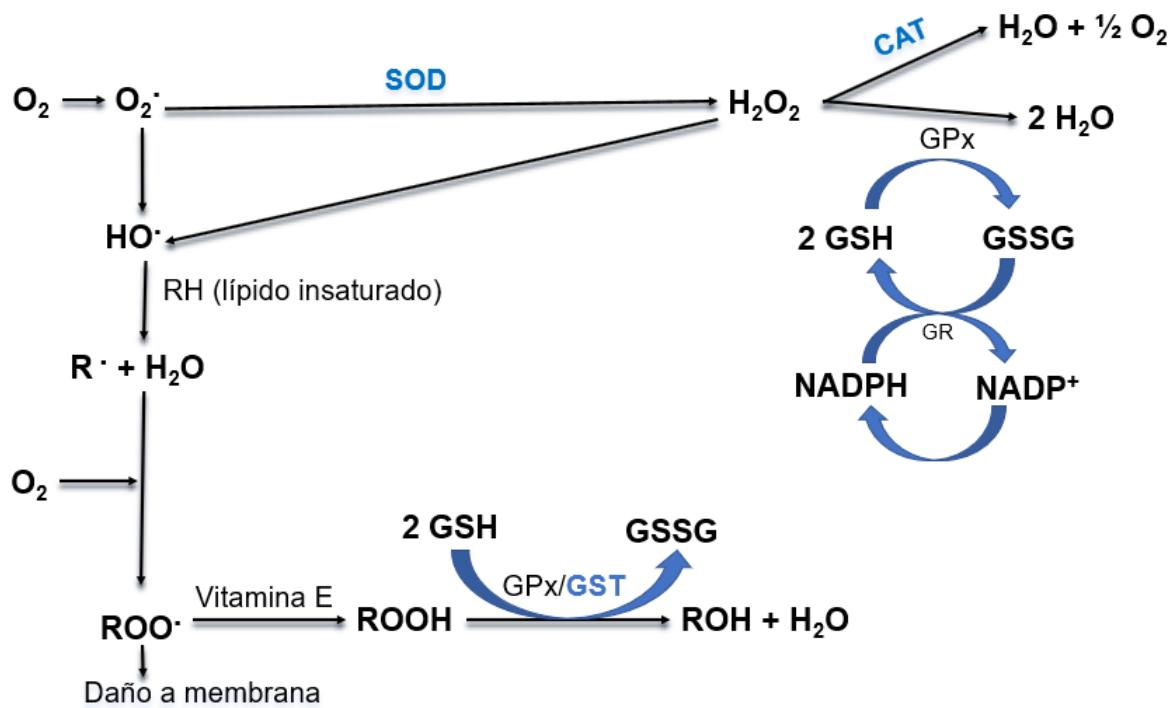


Figura 48. Esquema general de reacciones químicas correspondientes a los mecanismos de defensas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. O_2 : oxígeno; O_2^- : Anión superóxido; SOD: superóxido dismutasa, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; CAT: catalasa; HO^- : radical hidroxilo; R: radical; ROO^- : radical peroxilo; ROOH: Hidroperóxido orgánico; ROH: alcohol; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GST: glutatión-S-transferasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado.

Los cambios de los biomarcadores permiten evidenciar el impacto de la exposición y el efecto de los contaminantes en los organismos (Colin *et al.*, 2016). A los fines particulares de esta Tesis se centró el estudio en los antioxidantes enzimáticos SOD, CAT y GST y el antioxidante no enzimático: GSH.

3.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

- **Superóxido dismutasa (SOD).** Es una metaloenzima con varias isoformas, entre ellas: Cu/Zn-SOD presentes en el citoplasma y Mn-SOD que se encuentra en la mitocondria, en los peroxisomas, en el citosol, en los lisosomas y en el espacio extracelular (Patlevič *et al.*, 2016). Su función es acelerar la dismutación del O_2^- .



El H_2O_2 producido por la SOD, en presencia de metales de transición, puede ser precursor de una especie más reactiva, el OH^- .

- **Catalasa (CAT).** Esta enzima es una de las principales en los mecanismos de detoxificación a partir de la eliminación de las EROs. En vertebrados está localizada principalmente en peroxisomas y en mitocondrias (Hermes-Lima, 2004; Schlenk, 2005; Patlevič *et al.*, 2016) y dismuta al peróxido mediante la siguiente reacción:



- **Glutatión-S-transferasa (GST).** La transformación o metabolización de los xenobióticos consiste en 2 fases, la fase I: en la que los xenobióticos se convierten en metabolitos más polares y la fase II: conocida como la fase verdadera de detoxificación, cuya función es conjugar los productos del metabolismo directamente con otras moléculas endógenas polares, para su rápida eliminación en orina. La GST es una familia de enzimas de la fase II, que provee protección celular contra los efectos tóxicos de una amplia variedad de xenobióticos. Su rol es la detoxificación de productos del estrés oxidativo que surgen de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La GST permite proteger a la célula mediante la conjugación del GSH a sustratos electrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles, fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos (Hermes-Lima, 2004).

3.1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

- **Glutatión.** El GSH es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, su función antioxidante está determinada por el grupo sulfuro acido (-SH) de la cisteína. Puede reaccionar con el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el O_2^- y el OH^- , dos de los cuales ($^1\text{O}_2$; OH^-) actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados. Su principal rol fisiológico es la protección celular, pero también es importante su función en el metabolismo, biosíntesis, transporte y comunicación celular (Van der Oost *et al.*, 2003).

3.1.4. Daño oxidativo

El estrés oxidativo puede ocasionar diferentes efectos deletéreos en los organismos como aumento de la peroxidación lipídica, inhibición enzimática, oxidación de hormonas, daños en el ADN, entre otros efectos adversos (Pandey *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2020).

- **Peroxidación lipídica.** Los lípidos peroxidados forman hidroperóxidos lipídicos (LOOH) que pueden seguir dos vías metabólicas: a) reducción de LOOH por 1 e⁻ (catalizada por Fe²⁺), que da lugar a la formación del radical epoxialílico peroxilo (OLOO[·]) el cual, ingresa a la cadena de propagación de radicales libres interactuando con un ácido graso poliinsaturado. B) reducción por la GSH-peroxidasa a alcoholes (Timbrell, 2009; Girotti y Korytowski, 2016).

3.2. Hipótesis

Los plaguicidas organofosforados CPF y PMG son contaminantes presentes en los cuerpos de agua superficiales aledaños a zonas con actividad agropecuaria. Ambos plaguicidas pueden inducir estrés oxidativo, ocasionando efectos adversos sobre especies acuáticas como los peces de agua dulce.

3.3. Objetivos específicos

- Determinar parámetros de defensas antioxidantes (CAT, SOD y GSH); y alteraciones de la enzima detoxificante (GST) en un teleósteo nativo (*Cnesterodon decemmaculatus*), después de la exposición al herbicida glifosato y al insecticida clorpirifós.
- Evaluar daños a nivel celular a partir de la peroxidación lipídica, en *Cnesterodon decemmaculatus*, después de la exposición a glifosato y a clorpirifós

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Organismo de ensayo: *Cnesterodon decemmaculatus*

Los ejemplares de *C. decemmaculatus* fueron recolectados en la estación hidrobiológica de Chascomús, considerado como un sitio con bajo impacto antrópico, alejado de la actividad agrícola e industrial. En el Anexo 9 se describen los parámetros fisicoquímicos que se determinaron *in situ* y en el laboratorio después de haber realizado la campaña. Además, se cuantificaron plaguicidas y metales utilizando las mismas metodologías descritas en el Capítulo 1 apartado 1.4.4. y 1.4.5.

Los niveles de los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de metales no superaron en ninguno de los casos los niveles guía establecidos por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación para la protección de la vida acuática.

Una vez capturados los peces, los mismos se aclimataron por un período de 15 días en el Bioterio de Animales No Tradicionales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (BANT, FCEN-UBA) en agua del estanque sitio del muestreo, y durante un mes se reemplazó paulatinamente por AMD hasta alcanzar el 100%. El AMD fue preparado según protocolo US EPA (1993) descrito en el Capítulo 2 apartado 2.4.2.1. Los peces se mantuvieron en acuarios de vidrio, en condiciones de temperatura y luz controladas ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12 L:12 O), aireación constante, y fueron alimentados con comida comercial Tetra Fin®, finamente molida.

3.4.2. Bioensayos agudos de exposición a concentraciones subletales de glifosato y clorpirifós, para la determinación de efectos en parámetros biomarcadores de estrés oxidativo, en *C. decemmaculatus*.

Para determinar efectos sobre biomarcadores de defensas antioxidantes, detoxificación y estrés oxidativo en *C. decemmaculatus* después de la exposición a PMG y CPF, se realizaron bioensayos semiestáticos agudos de 96 h siguiendo lo establecido por la Norma IRAM 29112 (2008). Las concentraciones ensayadas fueron de 1 y 10 mg PMG \times L⁻¹ y 1 y 5 µg CPF \times L⁻¹, las cuales se seleccionaron teniendo en cuenta las concentraciones más

altas reportadas en bibliografía para cuerpos de agua superficial, y las cuantificadas en el arroyo de la subcuenca Las Catonas, monitoreado en el desarrollo de esta Tesis.

Para los ensayos de exposición, 48 h previas al bioensayo se seleccionaron, del stock, hembras de aproximadamente 2,7 - 3,0 cm de longitud total y se distribuyeron en recipientes de material plástico inerte de polipropileno. Se colocaron 4 ejemplares por recipiente, en 500 mL de AMD, manteniendo una relación de $1\text{ g} \times \text{L}^{-1}$. Los animales fueron aclimatados en AMD bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y fotoperíodo 12 L:12 O y se mantuvieron sin alimentación durante 24 h previas al bioensayo.

Las soluciones de PMG (1 y 10 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$) se prepararon por dilución con AMD de una solución madre de 200 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$, la cual se sonicó para garantizar su total disolución. Los medios de exposición a CPF (1 y 5 μg CPF $\times \text{L}^{-1}$) se prepararon a partir de una solución madre de 1.000 mg CPF $\times \text{L}^{-1}$ en etanol, por dilución con AMD. Se verificó y se ajustó el pH, con NaOH 4 M, de todos los medios, de tal manera que coincidieran con los valores del control.

Una vez preparadas las soluciones, a los recipientes que contenían los peces se les asignó al azar un tratamiento: control con AMD, control con AMD-EtOH, PMG (1 y 10 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$) y CPF (1 y 5 μg CPF $\times \text{L}^{-1}$), cada uno con sus respectivos duplicados. Los recipientes fueron parcialmente cubiertos, para minimizar la evaporación y mantener las concentraciones constantes. Transcurridas las 48 h de exposición, se renovaron completamente los medios. Se tomaron alícuotas de todas las soluciones de los medios a t_0 , $t_{48\text{h}}$ previo y posterior al recambio y $t_{96\text{h}}$, las cuales fueron conservadas a -20°C , para la posterior determinación de las concentraciones analíticas de los plaguicidas. En la Figura 49 se muestra el diseño experimental.

5 hembras (tamaño homogéneo) por recipiente.
 Medio AMD (pH = 7,4–7,8; dureza 80–100 mg CaCO₃ × L⁻¹, alcalinidad 60–70 mg CaCO₃ × L⁻¹).
 Aclimatación previa a 48 h en cámara.
 Exposición a concentraciones subletales.

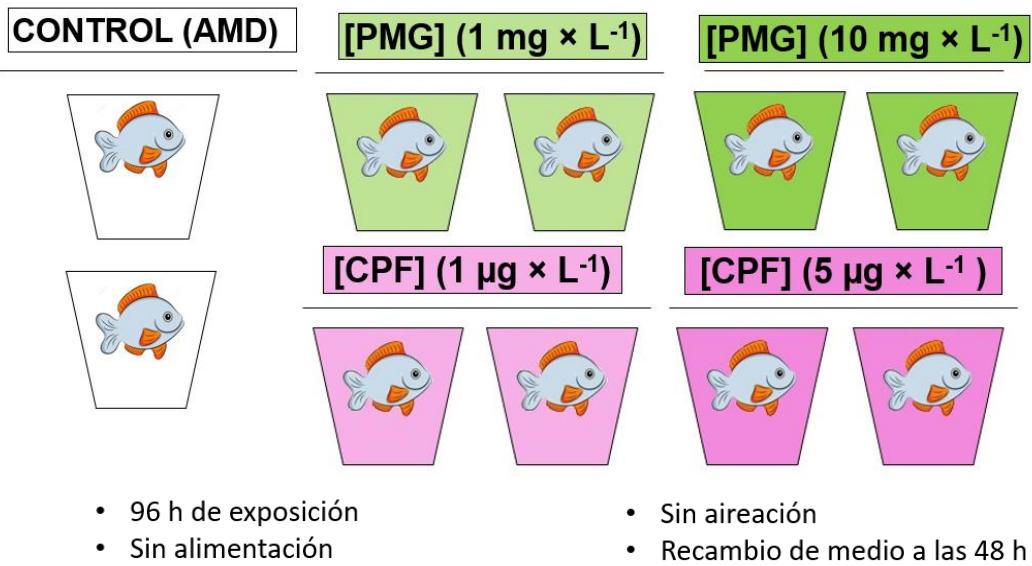


Figura 49. Diseño experimental de bioensayo semiestático agudo de exposición *in vivo* de *C. decemmaculatus* a concentraciones subletales de PMG y CPF.

3.4.3. Preparación de homogenatos

Finalizado el tiempo de exposición (96 h) se prepararon homogenatos de la fracción anterior, media y posterior de las hembras utilizadas en los bioensayos. En distintas alícuotas de estos homogenatos, se determinó el contenido de proteínas, parámetros de defensas antioxidantes (CAT, SOD y GSH), marcadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica (TBARS) y actividad de la enzima detoxificante (GST), como se describe en el apartado 3.4.4 de este Capítulo.

Los peces fueron anestesiados por inmersión en agua-hielo por 2 - 3 min. Luego de alcanzar su inmovilidad, se colocaron sobre una plancha de parafina refrigerada y se seccionó la médula con tijera de punta fina. Se hizo la disección en tres fracciones corporales: anterior (que corresponde a la cabeza); media (tejido muscular y vísceras) y posterior (tejido muscular). En la Figura 50 se muestran los tres cortes de disección. Las

fracciones corporales se pesaron en balanza analítica ($\pm 0,01$ mg). Las muestras se homogeneizaron con homogeneizador teflón-vidrio (20 golpes a 3.000 rpm).

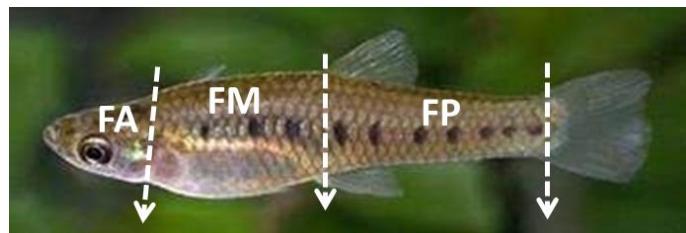


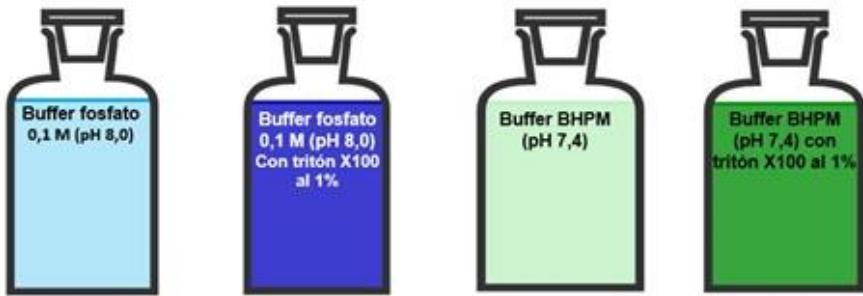
Figura 50. Disección de *C. decemmaculatus*. **FA:** Fracción anterior, **FM:** Fracción media y **FP:** Fracción posterior.

Los homogenatos de la FA y FP fueron preparados en buffer K_2HPO_4 0,1 M (pH 8,0) y FM en buffer post-mitocondrial (BHPM como se detalla en la Figura 51). Para los homogenatos en lo que se determinó CAT y GSH se utilizaron los mismos buffers, pero con Tritón X100 (Tx100) al 1%. El volumen del buffer (mL) fue calculado multiplicando el peso (g) por un factor de 15 para la fracción anterior y media y un factor de 10 para la posterior. Luego los homogenatos se centrifugaron a 10.000 g a 4°C durante 15 min en una centrífuga eppendorf y se descartó el pellet. buscar como se dice pellet
Todos los homogenatos se guardaron a -20°C para las determinaciones enzimáticas y no enzimáticas realizadas en las subsiguientes semanas.

En la Figura 51 se muestra un esquema de los diferentes tipos de homogenatos que se realizaron para las distintas fracciones corporales, los buffers que se utilizaron y las determinaciones que se realizaron con cada uno de ellos. La metodología utilizada para dichas determinaciones se describe en el siguiente apartado.

Soluciones

Buffers:



Buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0): K_2HPO_4 0,2M, KH_2PO_4 0,2M

Buffer post-mitocondrial (BHPM) (pH 7,4): NaH_2PO_4 0,1 M, KCl: 0,15M, EDTA: 1 mM

DTT: 1 mM y glicerina 10% v/v

Preparación de homogenatos:



Hembras

Fracción anterior (cabeza)

Homogenatos

Buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0)

Buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0) con tritón X100 al 1%



Fracción media (vísceras y músculo)

Homogenatos

Buffer BHPM (pH 7,4)

Buffer BHPM (pH 7,4) con tritón X100 al 1%



Fracción posterior (músculo)

Homogenatos

Buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0)

Buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0) con tritón X100 al 1%



Determinaciones:

Contenido de Proteínas, TBARS, GST, SOD

Contenido de Proteínas, CAT, GSH

Contenido de Proteínas, TBARS, GST, SOD

Contenido de Proteínas, CAT, GSH

Contenido de Proteínas, TBARS, GST, SOD

Contenido de Proteínas, GSH

Figura 51. Esquema de la preparación de homogenatos para las diferentes fracciones corporales según las determinaciones a realizar.

En el caso de las fracciones posteriores se homogenizó esta fracción de 2 peces que habían recibido igual tratamiento cuando el peso del tejido determinaba un volumen de homogenato que resultaba insuficiente para realizar las determinaciones programadas.

3.4.4. Determinación de biomarcadores de defensas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo

Para evaluar alteraciones en los niveles de las defensas antioxidantes, actividad de la enzima detoxificante y marcadores de estrés oxidativo (CAT, SOD, GSH, GST y TBARS), se pusieron a punto 5 técnicas de mediciones utilizadas previamente para otros organismos en el Laboratorio de Enzimología, Estrés Oxidativo y Metabolismo (LEEM-INQUIBICEN) y en el caso SOD se utilizó el protocolo propuesto por Cochón *et al.* (2007). Para las mediciones enzimáticas se realizaron ensayos preliminares variando las alícuotas de homogenato de cada fracción corporal para determinar el rango de linealidad. Para la determinación del contenido de TBARS (*Thiobarbituric Reactive Species*) se ensayaron diferentes tiempos de incubación seleccionando el tiempo de reacción que garantizaba la máxima formación del complejo. Para los niveles de glutatión total se prepararon los homogenatos utilizando buffers con Tx100 al 1%, metodología utilizada por otros autores en peces (Hasspieler *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2006), y se ajustaron los volúmenes de homogenato y de DTNB considerando el rango de la curva de calibración.

3.4.4.1. Actividad de la enzima catalasa

Para determinar la actividad CAT, se utilizó la técnica de Baudhuin *et al.* (1964), en la cual se sigue espectrofotométricamente el decaimiento de la absorbancia debida a la descomposición del H_2O_2 a $\lambda = 240$ nm (Figura 52).



Figura 52. Determinación de la actividad catalasa (CAT) a partir de la descomposición del peróxido de hidrógeno, el cual se determinó por espectrofotometría UV-Visible a 240 nm.

Las determinaciones se realizaron sobre los sobrenadantes de los homogenatos de la fracción anterior y media, preparados utilizando buffers con Tx100 al 1%. Las mediciones se realizaron en cubetas de cuarzo, utilizando alícuotas de 30 μL de homogenato y 0,965

mL de buffer fosfato NaH_2PO_4 50 mM (pH 7,2), a las que se adicionó 5 μL H_2O_2 2M. Los cambios en la absorbancia se registraron a 240 nm cada 4 seg durante 1 min. La actividad se calculó como $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ hidrolizado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteína. El coeficiente de extinción molar es $40 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. La actividad de la enzima catalasa se calculó como $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ hidrolizado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

3.4.4.2. Actividad de superóxido dismutasa

La actividad de SOD fue determinada en los sobrenadantes de todas las fracciones corporales, mediante la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo ($\lambda = 485$) En la Figura 53 se muestra la reacción.

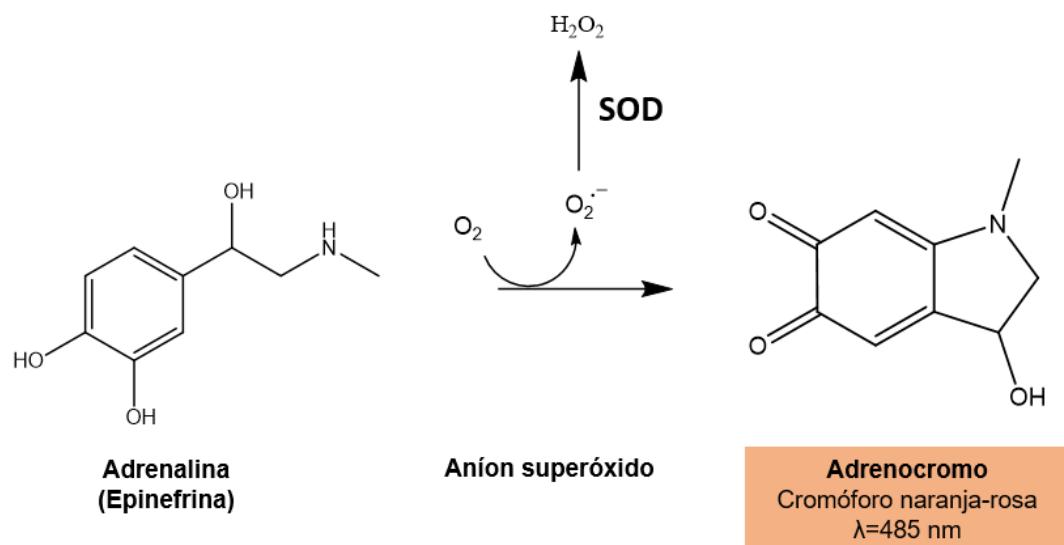


Figura 53. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) a partir de la inhibición de la autooxidación de la epinefrina, la cual se determinó por espectrofotometría UV-Visible a 485 nm.

Se utilizó la metodología propuesta por Cochón *et al.* (2007). Se utilizaron diferentes volúmenes de homogenato, llevando a 1 mL con buffer carbonato de sodio 50 mM (pH 10,2) con EDTA 10 mM y adicionando 50 μL de epinefrina 10 mM. El volumen final de la reacción fue 1,05 mL.

El resultado se expresó como unidades SOD, definiendo 1 unidad SOD como la cantidad de SOD requerida para causar la inhibición del 50% de la reducción fotoquímica del NBT.

La actividad específica (AE) quedó expresada como $(U) = \text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg proteínas})^{-1}$.

3.4.4.3. Contenido de glutatión total

La determinación del contenido de GSH se realizó a partir del método desarrollado por Anderson (1985) y Okamoto *et al.* (2001), el cual consiste en la oxidación secuencial de GSH por DTNB (ácido 5,5'-ditioobis-2-dinitrobenzoico) dando TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico), cuya absorbancia se mide a $\lambda = 412 \text{ nm}$. En la Figura 54 se muestra la reacción.

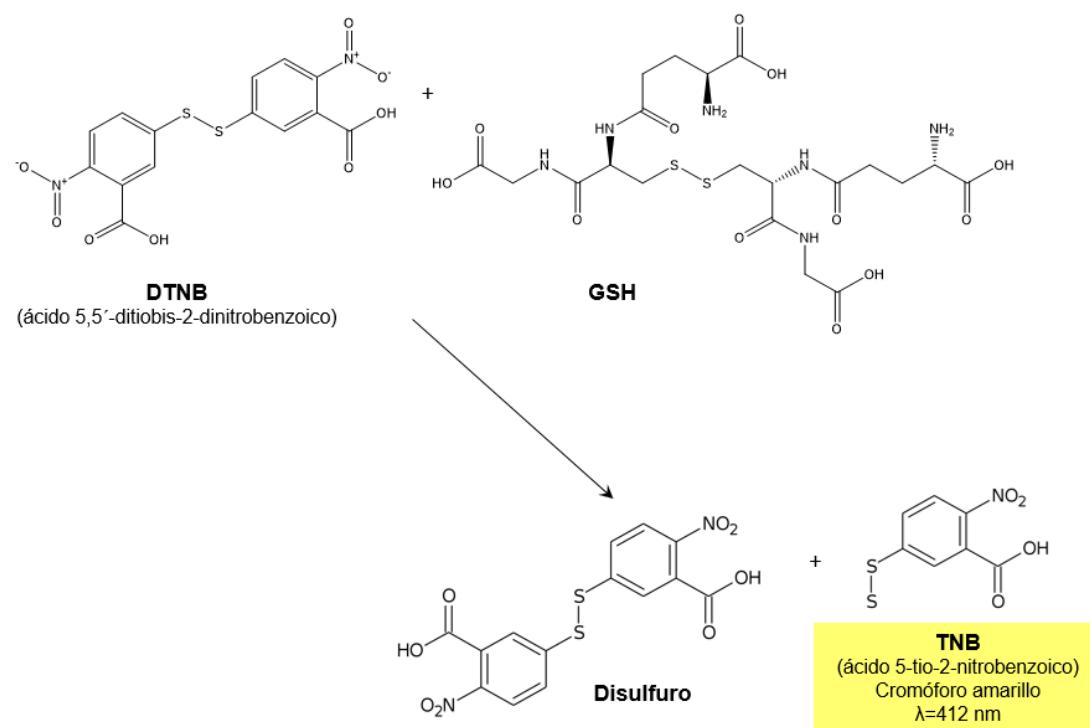


Figura 54. Determinación de contenido de glutatión total (t-GSH) a partir de la oxidación secuencial de GSH por DTNB, la cual se determinó por espectrofotometría UV-Visible a 412 nm.

A los sobrenadantes de los homogenados obtenidos con buffer con Tx100 1%, se los acidificó con ácido sulfosalicílico 10%, en una relación 1:0,5 (homogenato: ácido sulfosalicílico) para que precipitaran las proteínas. Luego se centrifugó a 11.000 g, a 4°C durante 10 min.

Para la determinación de GSH se utilizaron 200 μ L del sobrenadante de la fracción anterior o del posterior y 100 μ L de la media, completando el volumen de 665 μ L con buffer fosfato de sodio 0,143 M (pH 7,5) con EDTA 6,3 mM. Se agregó 335 μ L de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico 6 mM en buffer fosfato de sodio arriba mencionado) y se agitó utilizando un vortex para la mezcla de la solución. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se leyó la absorbancia a 412 nm.

El contenido de GSH se determinó a partir de una curva de calibración generada con GSH $1\mu\text{mol} \times \text{mL}^{-1}$ en ácido sulfosalicílico 10 %, con alícuotas para completar las siguientes concentraciones: 5, 10, 15 y 20 ó 5, 10, 20, 30 y 40 nmoles, según el rango de las concentraciones a determinar. Los resultados se expresaron en nmol GSH \times mg proteína $^{-1}$. Se verificó que la curva no cambiara al utilizar buffer Tx100 al 1%.

3.4.4.4. Glutatión-S-Transferasa

Para determinar la actividad GST, se utilizó el método de Habig *et al.* (1974). La determinación se realizó a partir del reactivo 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), el cual en presencia de GSH forma GS-dinitrobenceno (GS-DNB), que se mide a $\lambda = 340$ nm. En la Figura 55 se describe la reacción.

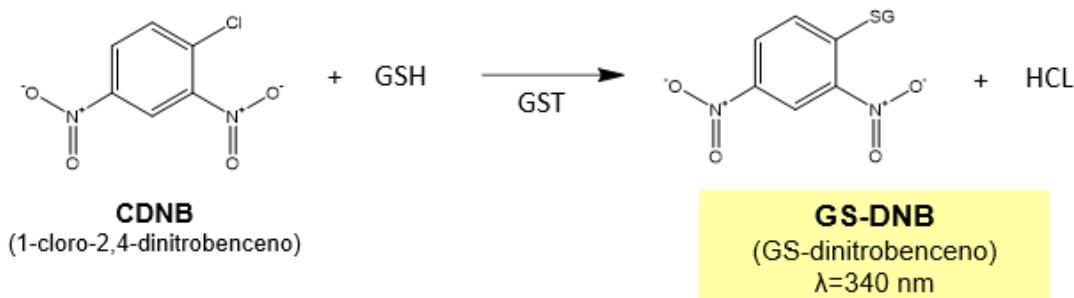


Figura 55. Determinación de la actividad glutatión S-transferasa (GST). Esta metodología se basa en la reacción catalizada por la GST entre el GSH (GSH) y el reactivo 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), formando GS-dinitrobenceno (GS-DNB) que se determinó por espectrofotometría UV-Visible a 340 nm.

Se midió la actividad GST del sobrenadante de los homogenatos, utilizando alícuotas de 30 μ L para todas las fracciones. En cubeta de cuarzo se agregó 950 μ L de buffer fosfato KH_2PO_4 100 mM (pH 6,5), 10 μ L de GSH 100 mM en buffer fosfato KH_2PO_4 (pH 6,5) y 10 μ L de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenceno 100 mM en etanol absoluto) como sustrato. Se

homogenizó la mezcla por inversión. Luego se registró el aumento en la absorbancia a 340 nm durante 5 min a intervalos de 16 seg. El coeficiente de extinción molar es $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles de CDNB conjugado formado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$.

3.4.4.5. Estimación de los niveles de peroxidación lipídica (contenido de TBARS)

Para estimar el contenido de TBARS, se utilizó el protocolo de Wills (1987), en el cual se monitorea la formación de un compuesto coloreado (color rosado) a 535 nm por reacción del malondialdehído (MDA), producto mayoritario de la degradación oxidativa de lípidos, con el ácido tiobarbitúrico (TBA). En la Figura 56 se muestra la reacción.

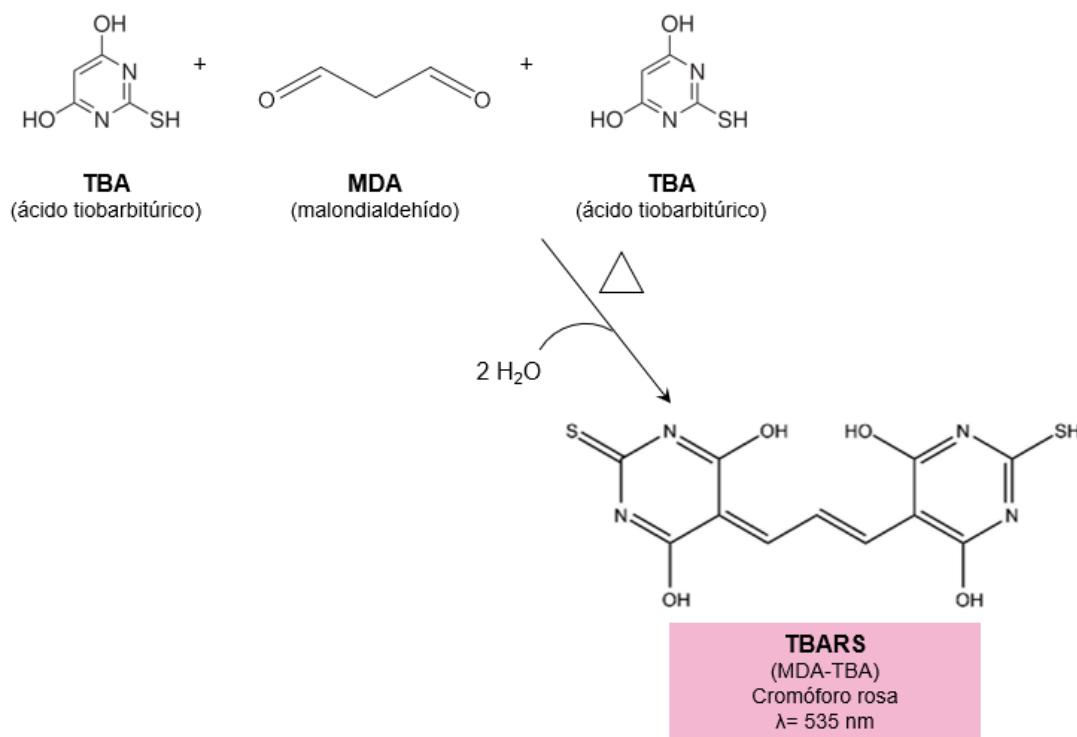


Figura 56. Determinación de la peroxidación lipídica (TBARS). El método se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA) y otros aldehídos no saturados. Una molécula de MDA reacciona estequiométricamente con dos moléculas de TBA. El complejo TBARS se determinó por espectrofotometría UV-Visible a 535 nm

A una alícuota de 175 μL de homogenato de la fracción anterior o del posterior, y de 81 μL de homogenato de la fracción media más 94 μL de buffer fosfato K_2HPO_4 0,1 M (pH 8,0), se les agregó 0,7 mL de reactivo (ácido tricloroacético 15% (v/v), ácido tiobarbitúrico 0,375% (p/v), HCl 0,25 M y butilhidroxitolueno 680 μM). La mezcla se calentó durante 45 min (fracción anterior) y 60 min (fracción media y posterior) a 100 °C. Las proteínas

precipitadas se separaron por centrifugación a 11.000 g, a temperatura ambiente durante 10 min. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes a $\lambda = 530$ nm. El coeficiente de extinción molar usado fue $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Los resultados se expresan como nmol TBARS $\times (\text{mg de proteína})^{-1}$.

3.4.4.6. Determinación de la concentración de proteínas tisulares

El contenido de proteínas se evaluó cuantitativamente mediante el método de Lowry *et al* (1951). Este método se basa en la detección del color azul que se genera al reaccionar el complejo proteína-cobre con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta coloración presenta una absorbancia máxima a 650 nm. La metodología utilizada fue descrita en el Capítulo 2. Los valores se expresaron como mg de proteínas $\times (\text{mL homogenato})^{-1}$.

3.4.5. Análisis estadístico

En todos los casos los parámetros se informaron indicando la media \pm ESM (n= número de valores promediados). Para el análisis de las defensas antioxidantes y la peroxidación lipídica, tanto para la comparación de los niveles basales entre las fracciones corporales como para la comparación entre los tratamientos y el grupo control, se aplicó el test ANOVA unifactorial. Se empleó el test de SHAPIRO-WILK para el estudio de normalidad de los datos obtenidos y el test de LEVENE'S para el estudio de la homogeneidad de las varianzas. Además, se utilizó el test de TUKEY para la evaluación de la media. Para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad y homocedasticidad se aplicó el análisis de Kruskal Wallis y el post test Dunns.

3.5. Resultados

Se analizaron los niveles basales de la actividad de las defensas antioxidantes y peroxidación lipídica en hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* durante la estación de verano. En la Tabla 24 se muestran los valores obtenidos para los diferentes biomarcadores en la fracción anterior, media y posterior de organismos control. Los ejemplares utilizados para esta caracterización presentaban una talla de $2,92 \pm 0,06$ cm, y peso 174 ± 13 mg (N =16).

Tabla 24. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T) y Peso corporal (Pc)) de ejemplares hembras de *C. decemmaculatus* control (no sometidos a exposición) en los que se determinaron las actividades CAT, GST, SOD, el contenido de GSH y los niveles de peroxidación lipídica (expresada como TBARS) en las diferentes fracciones corporales.

Biomarcador	Fracción anterior	Fracción media	Fracción posterior
CAT ($\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$)	$4,8 \pm 0,2^a$	27 ± 1^b	-
	n = 16	n = 16	
t-GSH ($\text{nmol} \times \text{mg de proteína}^{-1}$)	$5,5 \pm 0,3^a$	$8,7 \pm 0,2^b$	$7,6 \pm 0,2^b$
	n = 16	n = 16	n = 8
SOD ($\text{U} \times \text{mg de proteína}^{-1}$)	$10,6 \pm 0,7^a$	27 ± 3^b	$7,1 \pm 0,1^a$
	n = 16	n = 15	n = 10
GST ($\mu\text{moles} \times \text{mg de proteína}^{-1}$)	$0,070 \pm 0,004^a$	$0,025 \pm 0,001^b$	$0,021 \pm 0,001^b$
	n = 16	n = 16	n = 10
TBARS ($\text{nmol} \times \text{mg de proteína}^{-1}$)	$0,83 \pm 0,05^a$	$5,4 \pm 0,4^b$	$0,40 \pm 0,02^a$
	n = 16	n = 16	n = 10

Los valores se expresan como media \pm ESM. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre fracción anterior, media y posterior, analizadas para cada parámetro, $p<0,05$.

Los valores de la actividad de la enzima CAT fueron mayores en la fracción media con respecto a la actividad en la fracción anterior ($p<0,05$). En el mismo sentido, la actividad de SOD fue mayor en la fracción media, presentando diferencias significativas frente a la fracción anterior y posterior.

Por otro lado, en los niveles de GSH total no se encontraron diferencias entre la fracción media y posterior, pero sí se determinó un menor contenido de GSH en la fracción anterior.

Los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) fueron mayores en la fracción media, presentando diferencias significativas con respecto a la fracción anterior y posterior.

Al analizar los valores de GST, la actividad de la fracción anterior resultó significativamente mayor comparada con los niveles de la fracción media y posterior.

3.5.1. Efecto de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre parámetros de estrés oxidativo

Se evaluaron parámetros de defensas antioxidantes (CAT, GSH y SOD), un marcador de estrés oxidativo (TBARS) y alteraciones de la enzima detoxificante (GST), en *C. decemmaculatus* después de una exposición por 96 h a concentraciones subletales de los plaguicidas organofosforados objeto de este estudio: 1 y 10 mg PMG \times L⁻¹; y 1 y 5 μ g CPF \times L⁻¹.

3.5.1.1. Efecto de la exposición a glifosato sobre parámetros de estrés oxidativo en *C. decemmaculatus*

En los bioensayos realizados para la determinación del efecto de la exposición a glifosato sobre los biomarcadores de defensas antioxidantes, estrés oxidativo y enzima detoxificante se emplearon animales de talla homogénea. En la Tabla 25 se muestran los parámetros morfométricos de los peces utilizados.

Tabla 25. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C), Factor de condición (K)) de hembras de *C. decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos a 1 y 10 mg PMG \times L⁻¹. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=8).

Bioensayo	[PMG] (mg \times L ⁻¹)	L _T (cm)	P _C (mg)	K
Determinación CAT y GSH	0 (Control)	2,70 \pm 0,03	136 \pm 13	0,68 \pm 0,04
	1	2,68 \pm 0,02	128 \pm 14	0,65 \pm 0,06
	10	2,66 \pm 0,04	130 \pm 13	0,68 \pm 0,06
Determinación GST, SOD y TBARS	0 (Control)	3,07 \pm 0,05	195 \pm 5	0,67 \pm 0,02
	1	3,02 \pm 0,04	175 \pm 7	0,64 \pm 0,02
	10	3,05 \pm 0,04	190 \pm 7	0,67 \pm 0,03

No se observaron diferencias significativas entre los parámetros morfométricos (L_T, P_C y K) (p>0,05), las hembras utilizadas en cada bioensayo resultaron ser de talla homogéneas entre los diferentes tratamientos. No se observó mortalidad de los peces (0%) en el grupo control ni en los diferentes tratamientos de los bioensayos.

3.5.1.1.1. Actividad de catalasa

En la Figura 57 se grafican los valores obtenidos para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 10 mg PMG \times L $^{-1}$. En ninguna de las fracciones corporales se encontraron diferencias significativas en la actividad de CAT entre los ejemplares controles y tratados ($p>0,05$).

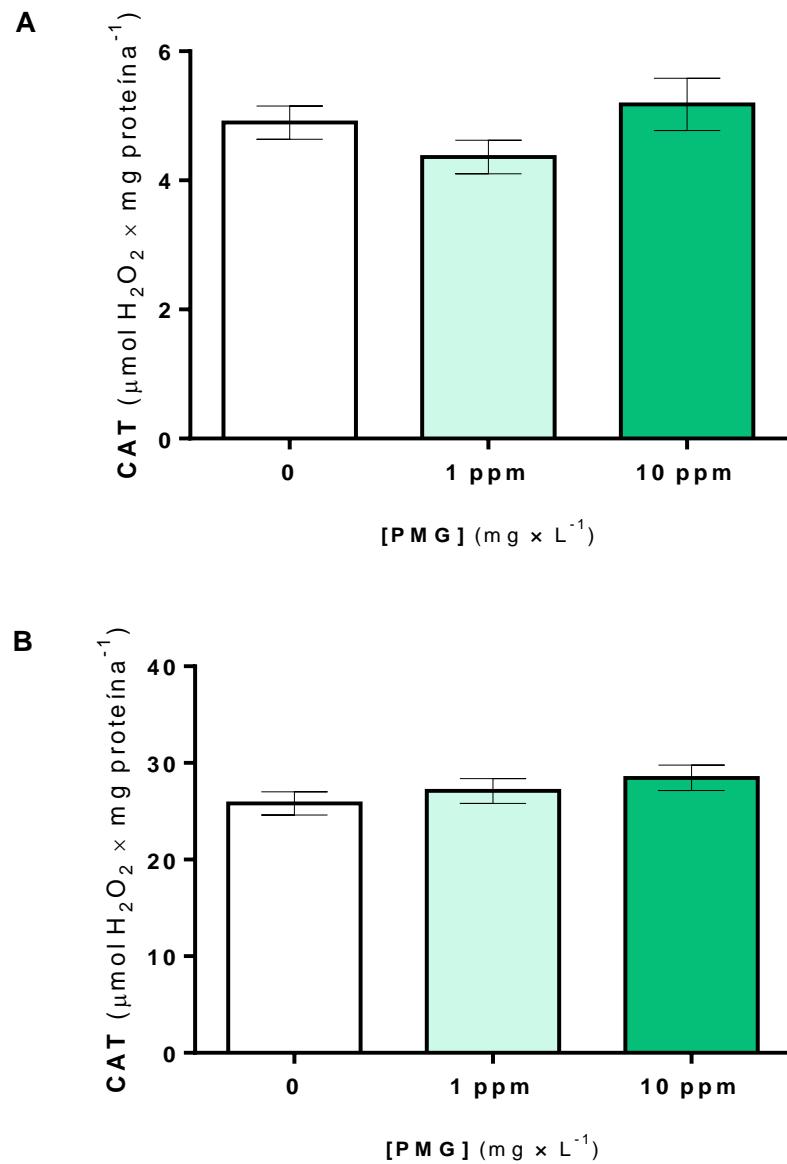


Figura 57. Actividad de catalasa (CAT) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 10 mg PMG \times L $^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=8$).

3.5.1.1.2. Niveles de glutatión total

Los niveles de GSH para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 10 mg PMG x L⁻¹ se observan en la Figura 58.

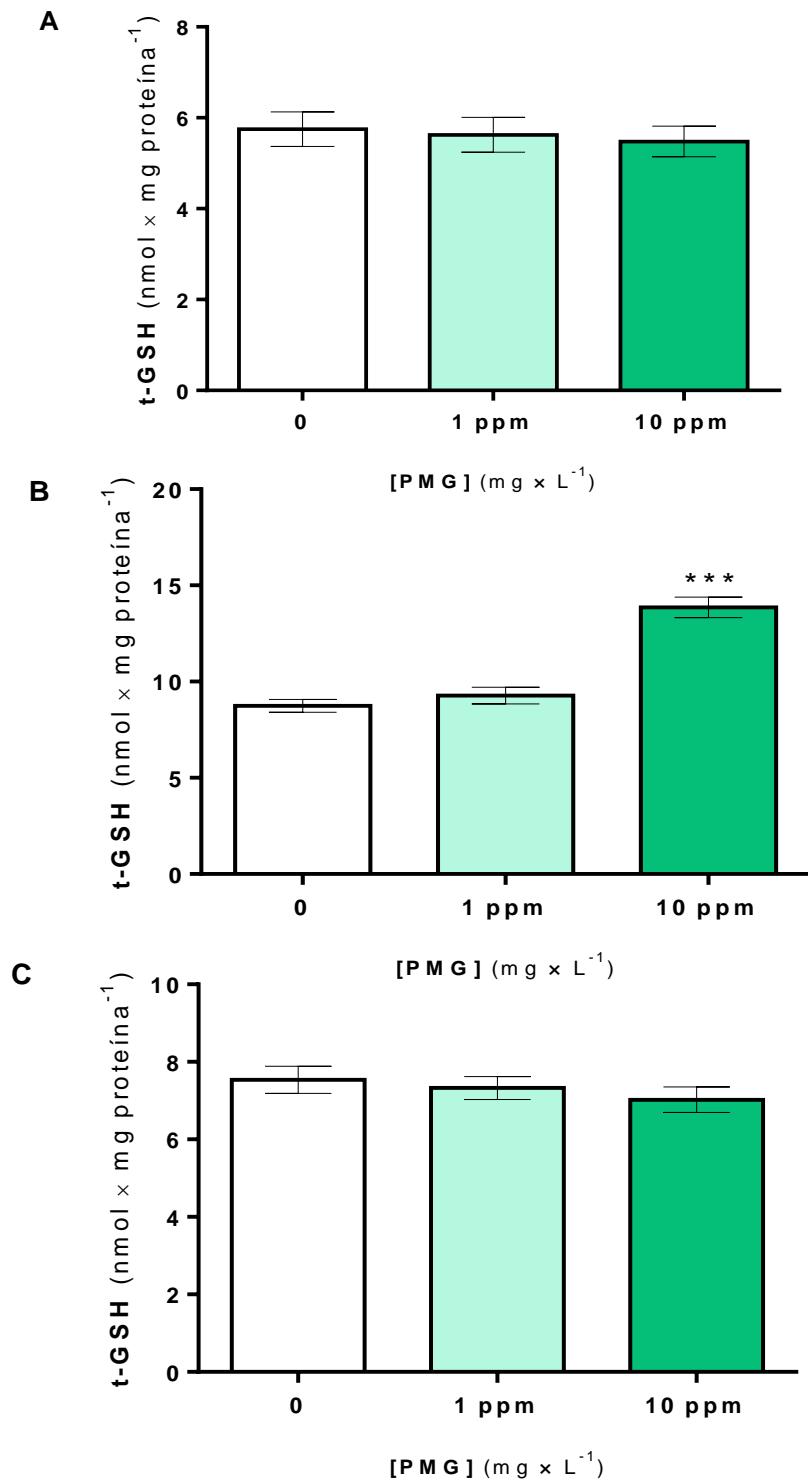


Figura 58. Contenido de glutación total (t-GSH) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 10 mg PMG \times L $^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=8). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; ***p<0,001.

Se evidenció un incremento estadísticamente significativo del 59% ($p<0,001$) en la fracción media para el grupo expuesto a $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$. En la fracción anterior y posterior no se obtuvieron diferencias significativas respecto del grupo control ($p>0,05$).

3.5.1.1.3. Actividad de glutatión-S-transferasa

En la Figura 59 se grafican los resultados obtenidos para la actividad de GST de los grupos control y los grupos expuestos a 1 y $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$.

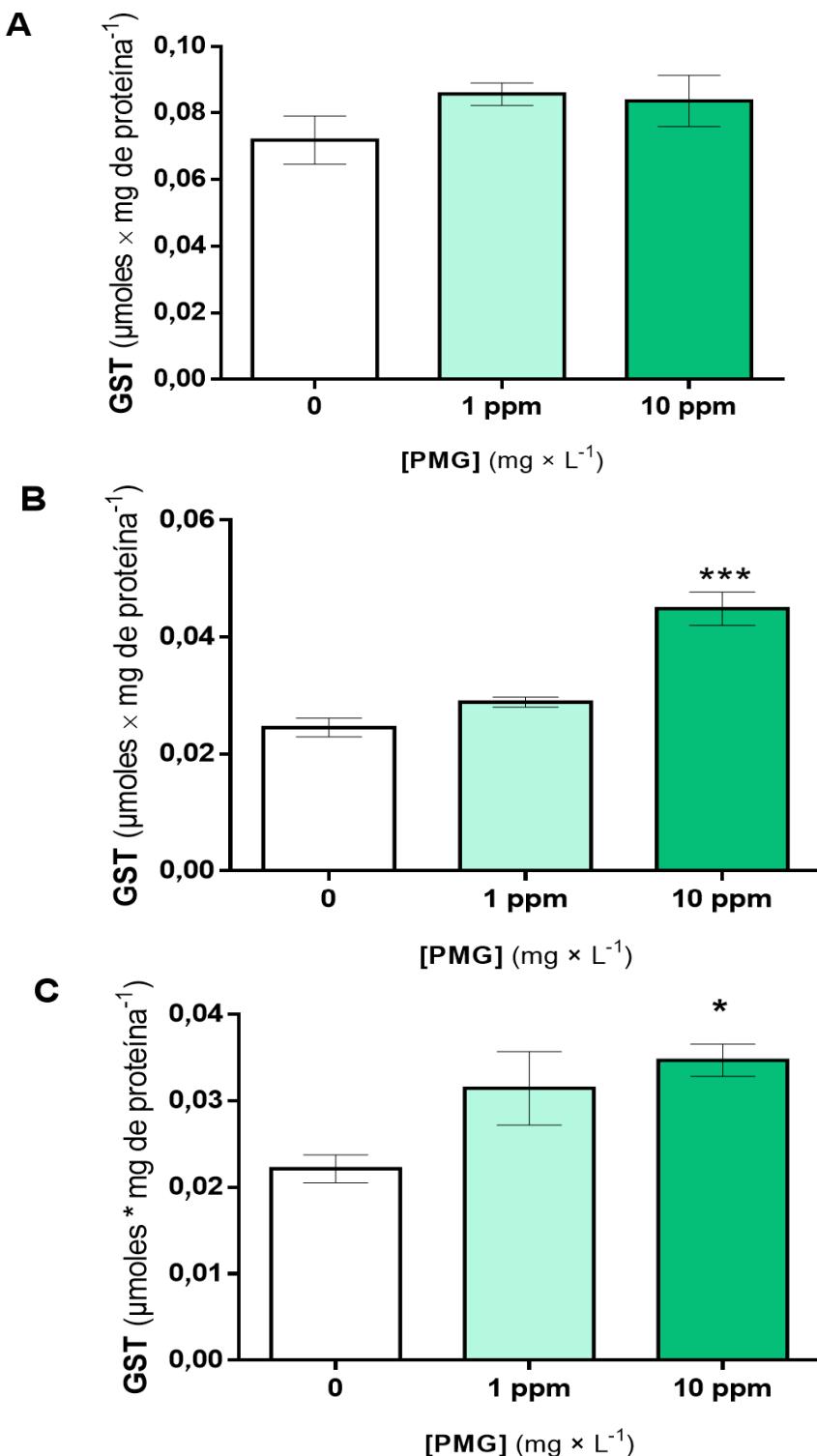


Figura 59. Actividad de glutatión-S-transferasa (GST) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 10 mg PMG \times L $^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=8). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *p<0,05 y ***p<0,001.

Por efecto de la exposición a PMG se determinó un aumento de la actividad de GST que resultó estadísticamente significativo para la exposición a $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$: del 83% ($p<0,001$) en la fracción media y del 57% ($p<0,05$) en posterior. Por otro lado, en la fracción anterior no se obtuvieron cambios significativos respecto al control.

3.5.1.1.4. Actividad de superóxido dismutasa

En la Figura 60 se presentan los resultados de la actividad SOD obtenidos para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$.

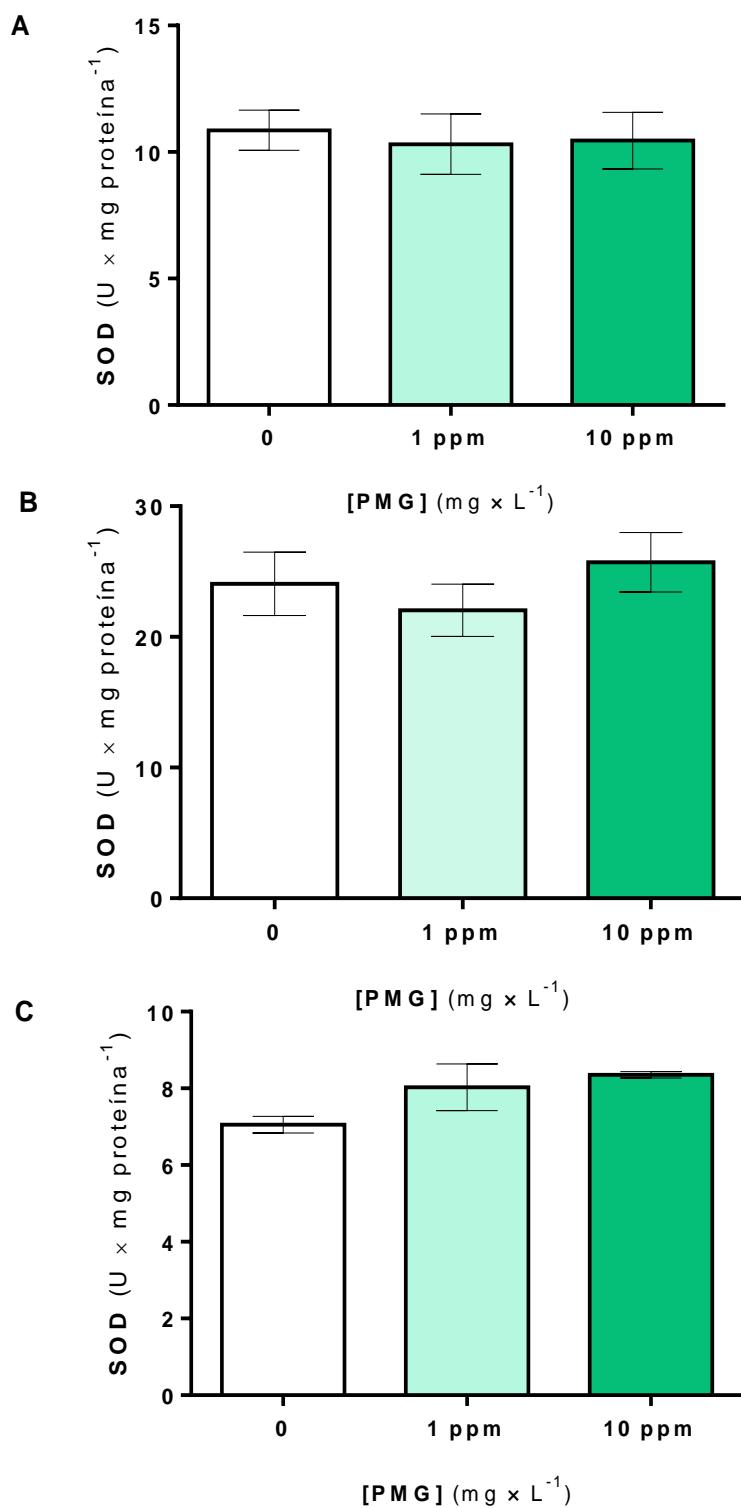


Figura 60. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 10 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=8$).

La actividad de SOD no presentó diferencias significativas en ninguna de las fracciones corporales después de la exposición a 1 y 10 mg PMG \times L⁻¹ respecto al grupo control (p>0,05).

3.5.1.1.5. Estimación de procesos de peroxidación lipídica

En la Figura 61 se grafican los valores de TBARS obtenidos para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 10 mg PMG \times L⁻¹.

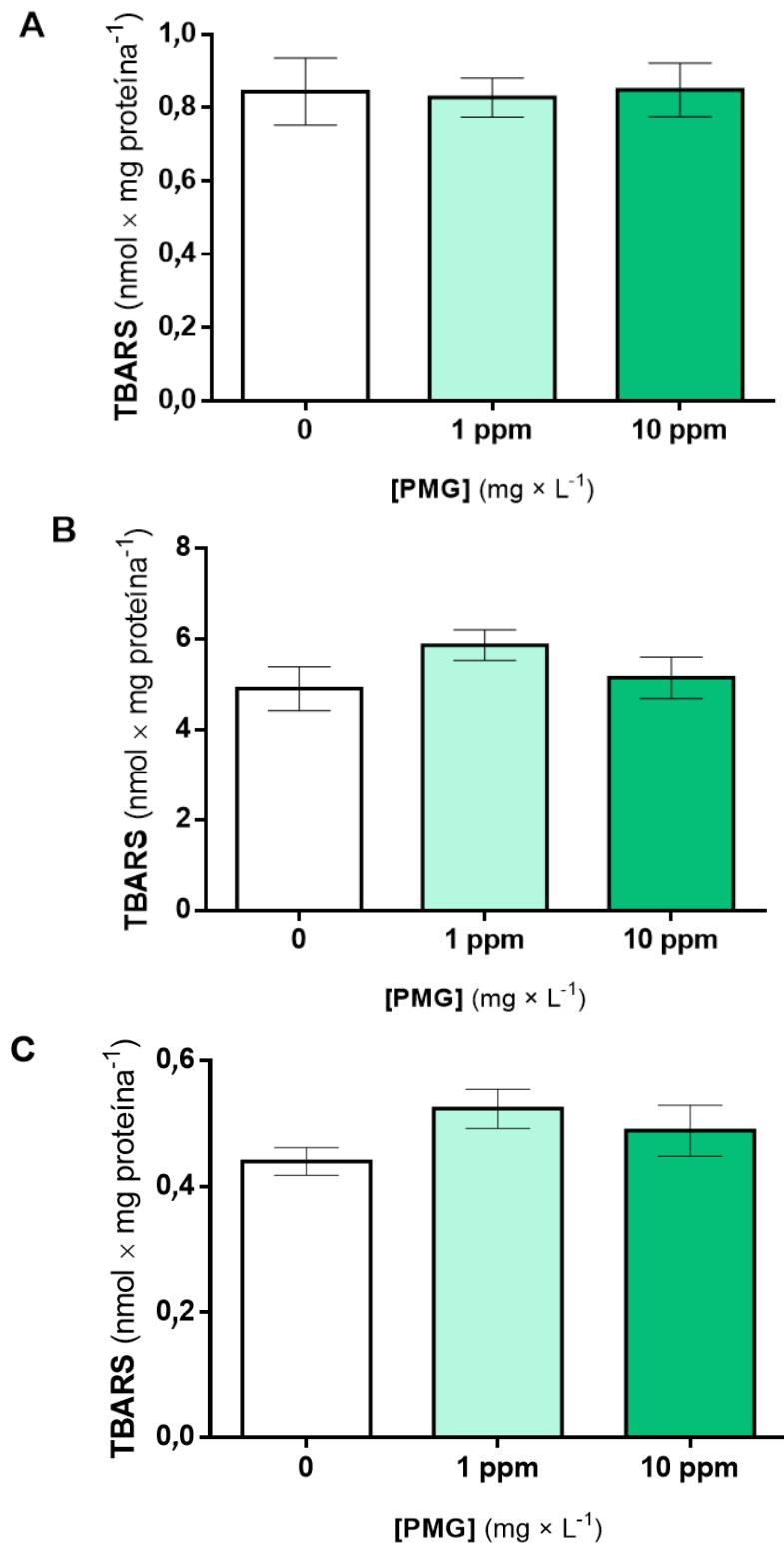


Figura 61. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 10 mg $\text{PMG} \times \text{L}^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=8$).

En los niveles de TBARS no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las fracciones corporales después de la exposición a las concentraciones de PMG ensayadas ($p>0,05$).

3.5.1.1.6. Concentraciones analíticas de glifosato en las soluciones de los bioensayos

En la Tabla 26 se detallan los valores de las concentraciones analíticas de PMG determinadas en alícuotas de los bioensayos.

Tabla 26. Concentración analítica de PMG determinada en alícuotas de los medios de los bioensayos recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final. Las concentraciones fueron determinadas por cromatografía líquida de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF). Los valores se expresan como media \pm ESM.

Concentraciones de glifosato en los medios de ensayo					
Bioensayo	Nominal [PMG] mg \times L $^{-1}$	Inicio de la exposición [PMG] mg \times L $^{-1}$	48 h (previo recambio) [PMG] mg \times L $^{-1}$	48 h (post recambio) [PMG] mg \times L $^{-1}$	96 h [PMG] mg \times L $^{-1}$
Determinación TBARS, GST, SOD	0 (Control)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	1	1,03 \pm 0,02	0,95 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02	0,79 \pm 0,02
		0,98 \pm 0,01	0,81 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,84 \pm 0,02
	10	9,88 \pm 0,01	8,91 \pm 0,01	10,10 \pm 0,02	9,25 \pm 0,01
		9,82 \pm 0,02	9,03 \pm 0,01	9,88 \pm 0,01	9,77 \pm 0,02
Determinación GSH, CAT	0 (Control)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	1	0,87 \pm 0,02	0,79 \pm 0,01	0,93 \pm 0,01	0,88 \pm 0,01
		0,91 \pm 0,01	0,80 \pm 0,01	0,95 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02
	10	9,86 \pm 0,01	8,38 \pm 0,02	10,99 \pm 0,02	9,72 \pm 0,02
		9,73 \pm 0,02	8,97 \pm 0,01	10,97 \pm 0,01	9,80 \pm 0,01

Como puede observarse las concentraciones analíticas de PMG resultaron similares a las nominales. No se observó en ninguno de los tratamientos una disminución relevante de la concentración, después de 48 h del bioensayo, previo al recambio, y luego del recambio

hasta el final de la exposición. La concentración disminuyó en promedio un 10% en estos períodos.

3.5.1.2. Efecto de la exposición a clorpirifós sobre parámetros de estrés oxidativo

En los bioensayos realizados para la determinación del efecto de la exposición a clorpirifós sobre los biomarcadores de defensas antioxidantes, estrés oxidativo y alteraciones de la enzima detoxificante se emplearon animales de talla homogénea. En la Tabla 27 se describen los parámetros morfométricos de los peces utilizados.

Para comprobar que la concentración de etanol utilizada, como solvente en los tratamientos de CPF, no causa efecto sobre los parámetros analizados, se realizó un control de etanol en AMD a una concentración equivalente a la presente en la solución más concentrada: EtOH 5×10^{-4} % (v/v).

Tabla 27. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_c), Factor de condición (K)) de hembras de *C. decemmaculatus* del grupo control y de los grupos expuestos (1 y 5 μ g CPF $\times L^{-1}$). Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 8$).

Bioensayo	[CPF] (μ g $\times L^{-1}$)	L_T (cm)	P_c (mg)	K
Determinación CAT y GSH	0 (Control)	$2,70 \pm 0,03$	136 ± 13	$0,68 \pm 0,04$
	0 (Control EtOH)	$2,73 \pm 0,04$	144 ± 19	$0,68 \pm 0,07$
	1	$2,78 \pm 0,05$	154 ± 14	$0,71 \pm 0,05$
	5	$2,70 \pm 0,05$	134 ± 10	$0,68 \pm 0,06$
Determinación GST, SOD y TBARS	0 (Control)	$3,07 \pm 0,05$	195 ± 5	$0,67 \pm 0,02$
	0 (Control EtOH)	$3,16 \pm 0,06$	207 ± 7	$0,71 \pm 0,02$
	1	$3,07 \pm 0,04$	202 ± 14	$0,69 \pm 0,05$
	5	$3,02 \pm 0,05$	184 ± 9	$0,67 \pm 0,02$

Los valores morfométricos de talla, peso y factor de condición entre el grupo control y los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) verificándose su homogeneidad. La mortalidad de los peces del grupo control y los expuestos fue del 0%.

3.5.1.2.1. Actividad de catalasa

Los niveles de actividad de CAT de la fracción anterior y media de las hembras de *C. decemmaculatus* de los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ se presentan en la Figura 62.

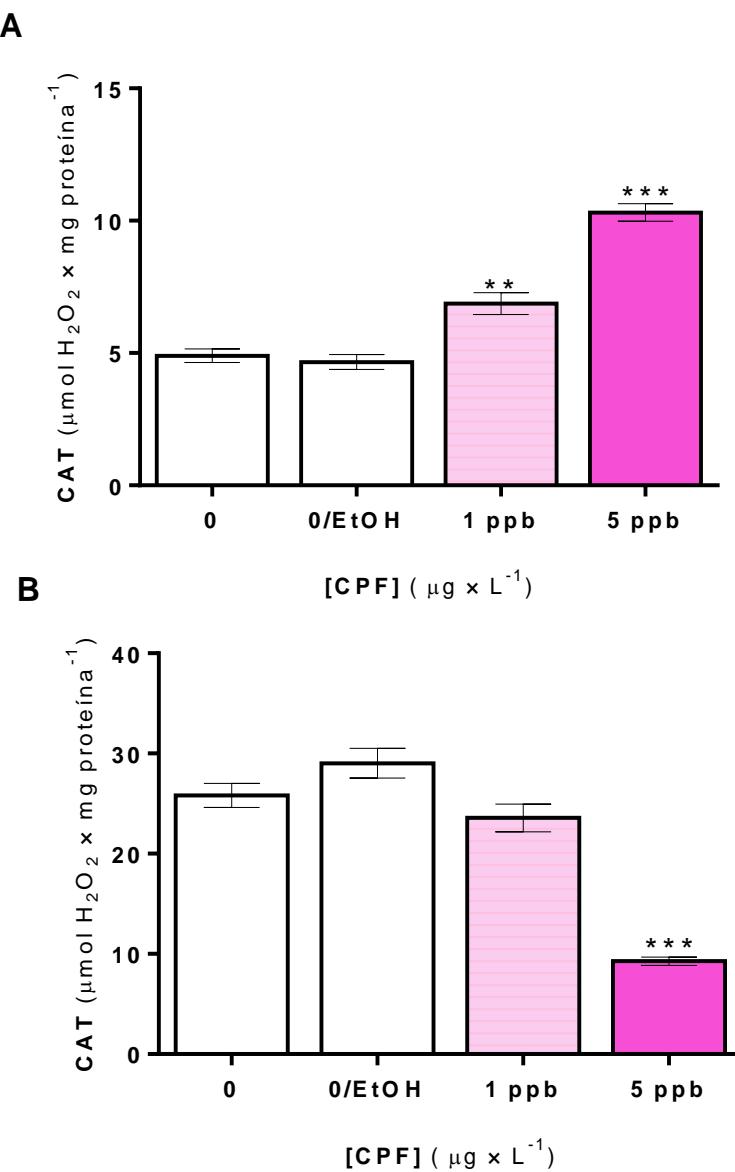


Figura 62. Actividad de catalasa (CAT) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. Los valores se expresan como media \pm ESM (n= 8). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; **p<0,01 y ***p<0,001.

No se observaron diferencias significativas de la actividad de CAT en ninguno de las fracciones corporales entre el grupo control con etanol en AMD y el grupo control contenido sólo AMD.

En la fracción anterior la actividad CAT presentó un aumento significativo del 40 % ($p<0,01$) en los organismos expuestos a $1 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y del 111% ($p<0,001$) para la exposición a $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$.

En la fracción media la actividad CAT disminuyó con respecto al control, siendo una disminución significativa de un 64 % ($p<0,001$) para el tratamiento de mayor concentración.

3.5.1.2.2. Niveles de glutatión total

En la Figura 63 se grafica el contenido de GSH para las diferentes fracciones corporales obtenido para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$.

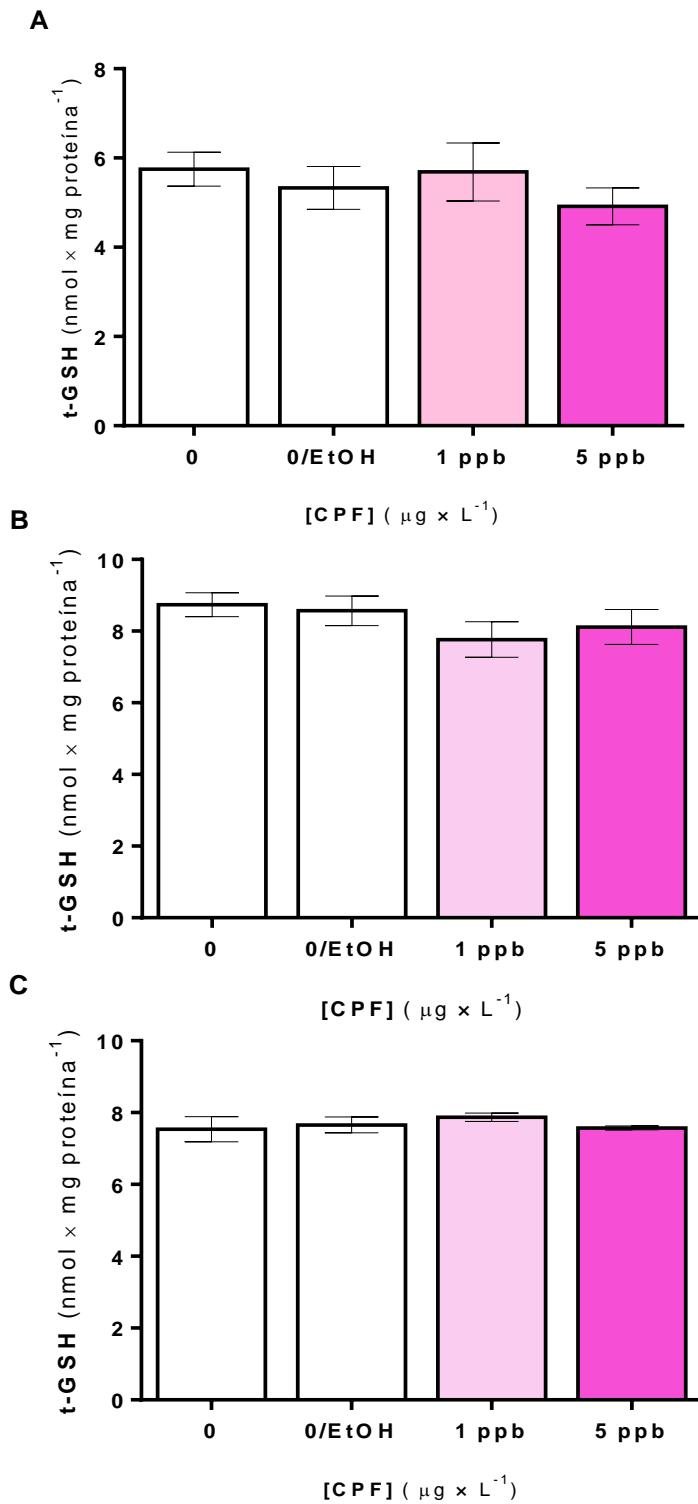


Figura 63. Contenido de glutatión total (t-GSH) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 5 μg CPF $\times \text{L}^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Facción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=8).

En ninguna de las fracciones corporales se obtuvieron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los organismos control y los expuestos a las concentraciones ensayadas.

3.5.1.2.3. Actividad de glutatión-S-transferasa

La actividad de GST para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ se muestra en la Figura 64.

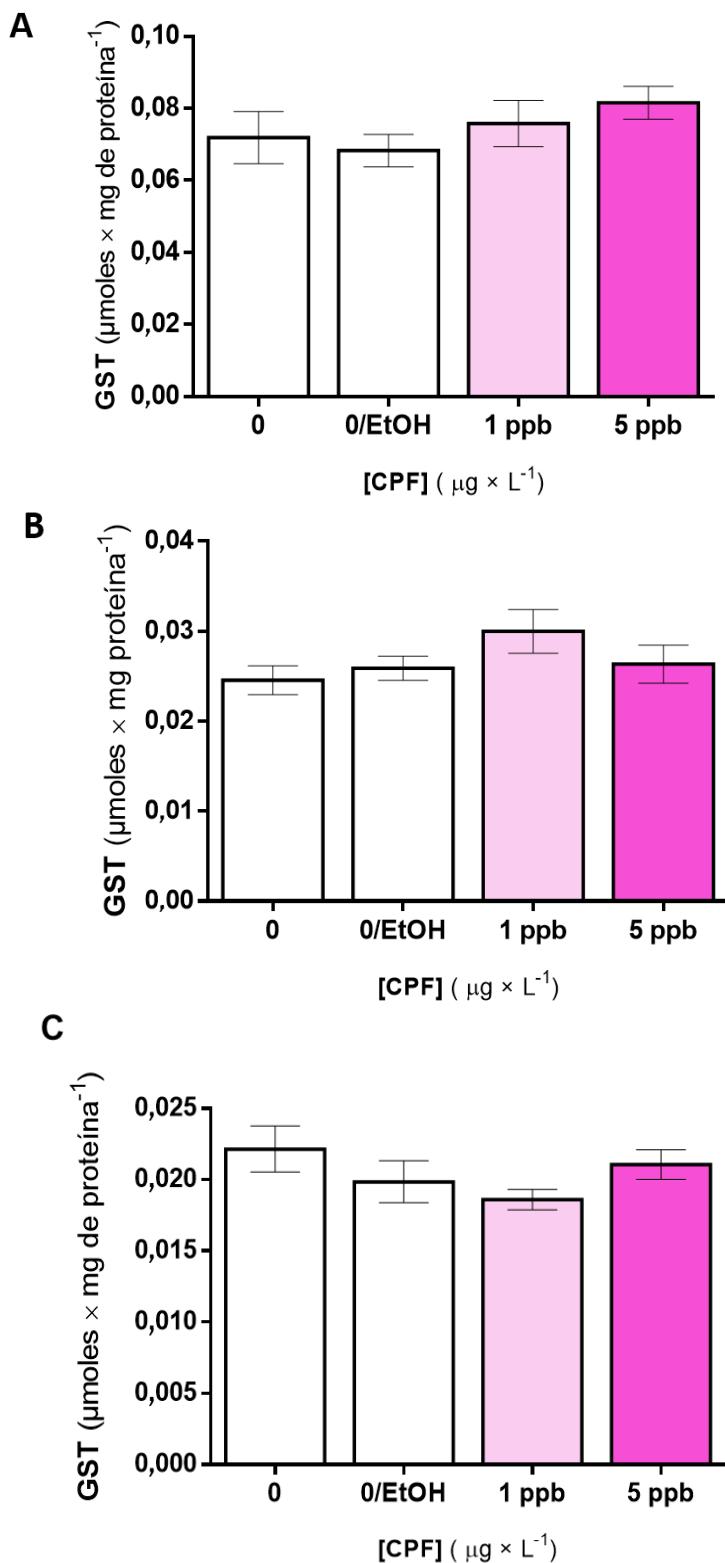


Figura 64. Actividad de glutatión-S-transferasa (GST) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g} \text{ CPF} \times \text{L}^{-1}$ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=8$).

No se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las fracciones corporales para ninguna de las concentraciones de CPF ($p>0,05$).

3.5.1.2.4. Actividad de superóxido dismutasa

En la Figura 65 se grafican los resultados obtenidos de la actividad de SOD para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$.

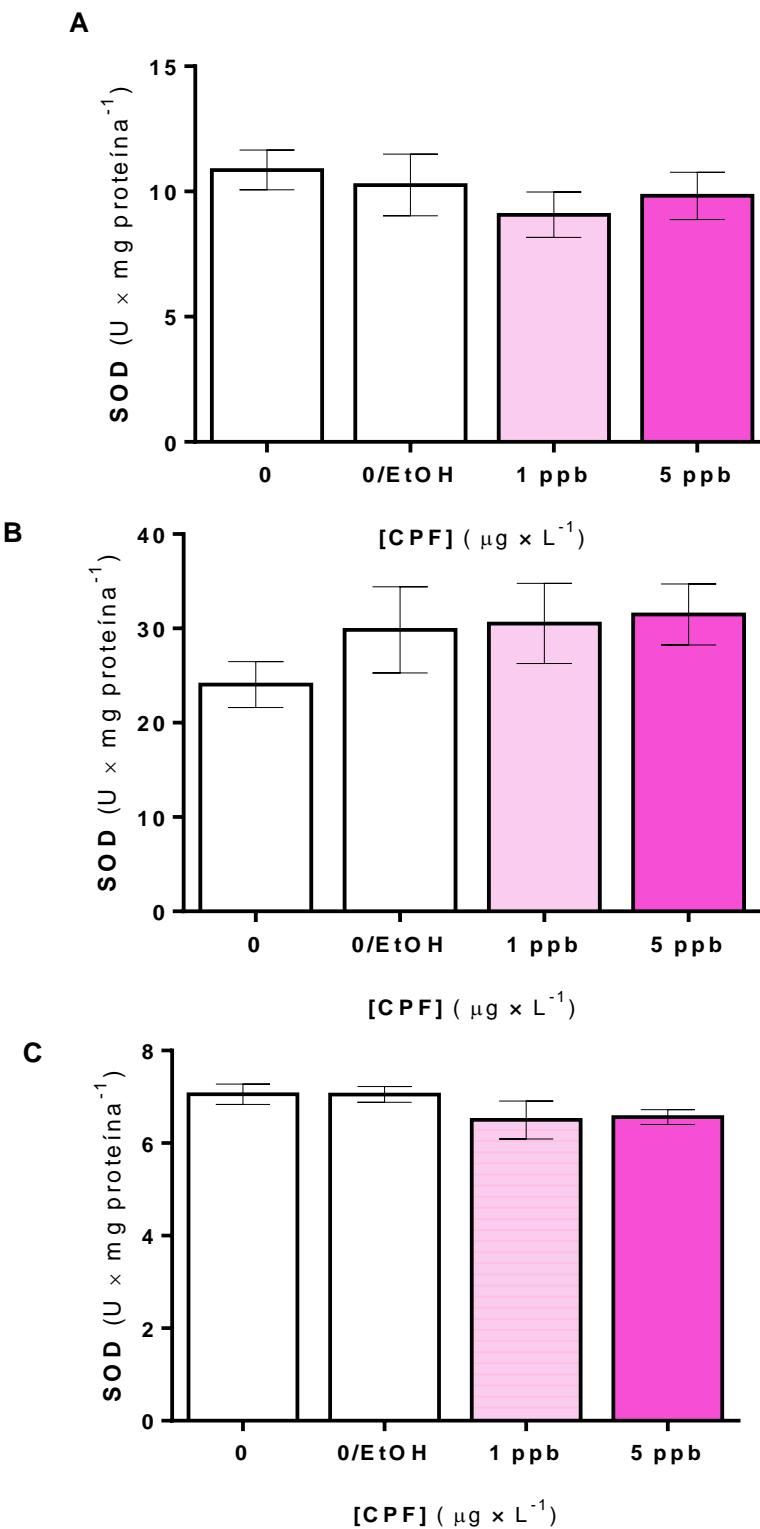


Figura 65. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 5 μ g CPF \times L⁻¹ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=8).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas con respecto a los grupos control en ninguna de las fracciones corporales para ninguna de las concentraciones de CPF ensayadas ($p>0,05$).

3.5.1.2.5. Estimación de procesos de peroxidación lipídica

En la Figura 66 se presentan los valores de TBARS obtenidos para los grupos control y los grupos expuestos a 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$.

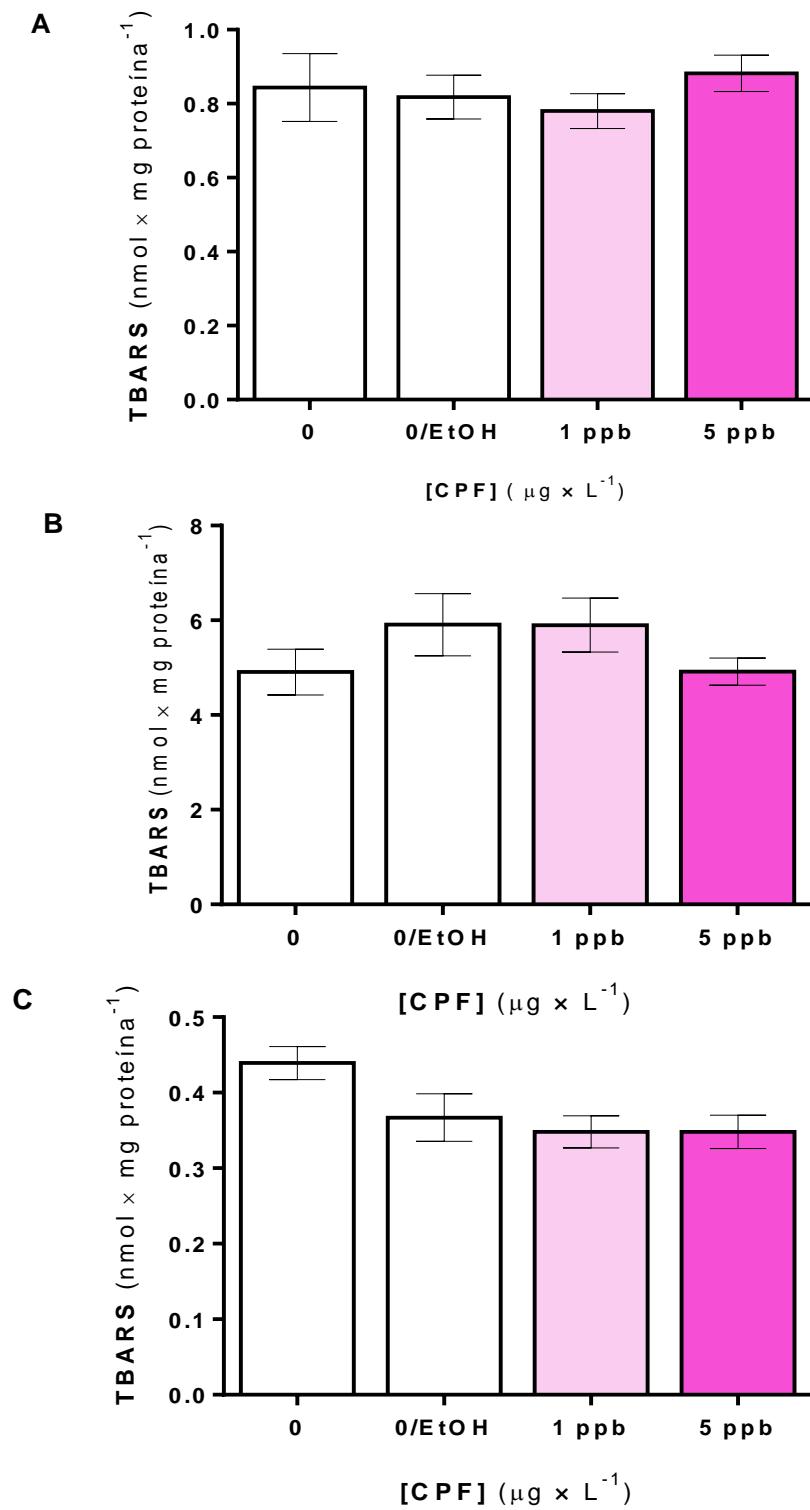


Figura 66. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS) en fracciones corporales de hembras de *C. decemmaculatus* expuestos a 1 y 5 μg CPF x L⁻¹ o mantenidos en medio control durante 96 h. **A:** Fracción anterior. **B:** Fracción media. **C:** Fracción posterior. Los valores se expresan como media ± ESM (n=8).

Al comparar los niveles de TBARS obtenidos en los grupos control con los obtenidos en los tratamientos de exposición a CPF las diferencias no resultaron estadísticamente significativas para ninguna de las fracciones corporales a ninguna de las concentraciones ensayadas ($p>0,05$).

3.5.1.2.6. Concentraciones analíticas de clorpirifós en las soluciones de los bioensayos

En relación con las concentraciones analíticas de CPF determinadas en alícuotas de los bioensayos, las mismas se describen en la Tabla 28. Como puede observarse las concentraciones analíticas resultaron similares a las nominales. Transcurridas las 48 h del bioensayo, previo al recambio, y luego del recambio hasta el final de la exposición, no se observó en ninguno de los tratamientos una disminución relevante de la concentración.

Tabla 28. Concentración analítica de CPF determinada en alícuotas de los medios de los bioensayos recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final. Las concentraciones fueron determinadas por cromatografía líquida de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF). Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=2$).

Concentraciones de clorpirifós en los medios de ensayo					
Bioensayo	Nominal [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	Inicio de la exposición [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	48 h (previo recambio) [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	48 h (post recambio) [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	96 h [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$
Determinación TBARS, GST, SOD	Control 0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	1	1,06 \pm 0,01	1,03 \pm 0,01	1,02 \pm 0,01	0,99 \pm 0,02
		1,07 \pm 0,01	1,01 \pm 0,01	1,04 \pm 0,01	1,01 \pm 0,01
	5	5,05 \pm 0,02	4,93 \pm 0,01	5,12 \pm 0,02	4,86 \pm 0,01
		4,99 \pm 0,02	4,83 \pm 0,01	5,13 \pm 0,01	4,87 \pm 0,01
	Determinación GSH, CAT	Control 0	< 0,5	< 0,5	< 0,5
			< 0,5	< 0,5	< 0,5
		1	1,09 \pm 0,01	0,98 \pm 0,01	0,98 \pm 0,01
			1,07 \pm 0,01	0,94 \pm 0,02	0,99 \pm 0,01
		5	4,99 \pm 0,02	4,88 \pm 0,01	4,99 \pm 0,02
			5,01 \pm 0,02	4,89 \pm 0,01	4,97 \pm 0,01

3.6. Discusión

La exposición a plaguicidas puede causar un aumento en la producción de EROs, generando daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos al superar la capacidad antioxidante de las células (Monserrat *et al.*, 2007; Lushchak 2011; Patlevič *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2022). En este contexto, considerando los resultados en relación con los efectos neurotóxicos y los antecedentes, nos planteamos analizar el rol del estrés oxidativo en la toxicidad del glifosato, y a la vez, en forma comparativa, los efectos de la exposición a clorpirifós.

3.6.1. Alteraciones de defensas antioxidantes, la actividad de la enzima detoxificante glutatión-S-transferasa y marcadores de estrés oxidativo después de la exposición a glifosato.

Algunos autores han propuesto al estrés oxidativo como una vía inespecífica en diferentes estudios ecotoxicológicos en peces expuestos a distintos plaguicidas (Parvez y Raisuddin, 2005; Monteiro *et al.*, 2006; Kavitha y Venkateswara Rao, 2007; Slaninova *et al.*, 2009). En esta Tesis se determinaron algunos parámetros de estrés oxidativo en *C. decemmaculatus* con el objetivo de comprender los posibles mecanismos de toxicidad del PMG. Las enzimas antioxidantes y los sistemas no enzimáticos son esenciales para la conversión de EROs en metabolitos menos reactivos y para proteger y restaurar el metabolismo y la función celular después de la exposición a un contaminante (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2011).

En primer lugar, es de destacar que existen numerosos trabajos que han descripto la existencia de efectos de estrés oxidativo en peces dulceacuícolas luego de la exposición aguda o crónica a formulados de glifosato. Sin embargo, los antecedentes con relación a los efectos de la exposición al principio activo son escasos. Zheng *et al.* (2021) han reportado diversos efectos de la exposición crónica de *Oreochromis nicotilus* a PMG, entre ellos un incremento significativo en los niveles de MDA y una disminución de las actividades SOD, CAT y GSH. Estos autores describen también que la exposición genera cambios en la expresión génica, mostrando un efecto adverso en la vía Nrf2, que actúa en el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias. En el mismo sentido, Webster y Santos (2015) estudiaron en la trucha marrón (*Salmo trutta*)

la respuesta de la exposición subcrónica (14 días) a PMG y al formulado Roundup a través del estudio del perfil transcriptómico global, concluyendo que los cambios observados eran consistentes con la generación de estrés oxidativo y la inducción de respuestas compensatorias.

En este marco nuestros resultados aportan al análisis, en el teleósteo nativo *C. decemmaculatus*, de los procesos involucrados en la toxicidad de exposiciones agudas a PMG.

La primera línea de defensa contra el estrés oxidativo involucra a las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, que pueden proteger a los organismos del daño oxidativo mediante la eliminación de EROs (Stara *et al.*, 2012). Si el H_2O_2 no es metabolizado puede generar $HO\cdot$ (a través de la reacción de Fenton), que es la más reactiva de las EROs e interactúa con los lípidos de la membrana celular (Hermes-Lima, 2004). Con relación a los resultados obtenidos se destaca que, en ninguna de las fracciones corporales, la actividad de las enzimas CAT y SOD presentó cambios significativos entre los peces sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Observaciones similares fueron reportadas en *Prochilodus lineatus* después de 96 h de exposición a Roundup Transorb (Modesto y Martínez, 2010a, 2010b). Sin embargo, Zheng *et al.* (2021) obtuvieron una disminución de estas enzimas en hígado de *Oreochromis nicotilus* luego de la exposición crónica (80 días) a 0,2 - 16 mg PMG \times L⁻¹. Estas diferencias podrían deberse a una variación de la susceptibilidad entre las especies, como al mayor tiempo de exposición analizado en dicho trabajo. En cuanto a estos parámetros, existen antecedentes en los que se evalúa la exposición aguda a formulados de glifosato y se reportan resultados que difieren de los obtenidos en esta Tesis. Se ha observado la disminución en la actividad de estas enzimas en diferentes tejidos después de la exposición a formulados de glifosato, en el pez híbrido *Leiarius marmoratus* \times *Pseudoplatystoma reticulatum* (de Moura *et al.*, 2017), en *Pseudoplatystoma* sp (Sinhorin *et al.*, 2014) y en *Brycon amazonicus* (Blasco *et al.*, 2021).

La enzima GST juega un papel importante en la detoxificación y excreción de xenobióticos al conjugar una molécula de GSH a un metabolito o al compuesto original y de esta manera promover, en el organismo, la eliminación del contaminante (Leaver *et al.*, 1992). El rol fisiológico de esta enzima es catalizar la conjugación del GSH con centros electrofílicos de una gran variedad de sustratos endógenos (por ejemplo, lípidos

peroxidados) y exógenos (por ejemplo, xenobióticos orgánicos) (Abele *et al.*, 2012). Luego de la exposición a $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$ se evidenció, en la fracción media, un aumento de la actividad de GST del 83% y de los niveles de GSH del 59%, mientras que en la fracción posterior el incremento de GST fue del 57%. La enzima GST se ha utilizado como biomarcador de estrés oxidativo en varios tejidos de diferentes especies de peces, tanto en laboratorio como en condiciones naturales (Aksoy *et al.*, 2016). El GST y la GPx contribuyen a la detoxificación de los productos de estrés oxidativo (Maran *et al.*, 2009), protegiendo al organismo de sus efectos deletéreos. Se ha demostrado el aumento de la actividad de esta enzima en presencia de contaminantes orgánicos (Machala *et al.*, 1997). En este trabajo, el aumento observado en la actividad de GST, ante la exposición al contaminante PMG, resulta indicativo de la existencia de procesos de detoxificación de este plaguicida o sus metabolitos por parte de esta enzima que permitan disminuir la toxicidad de este contaminante y facilitar su eliminación. Por lo tanto, estos resultados sugieren que GST estaría involucrada en la vía de detoxificación del PMG. Este aumento de la actividad de la enzima GST es consistente con los hallazgos de otros autores, después de la exposición a formulados de glifosato de diferentes especies: *Prochilodus lineatus* (Modesto y Martínez, 2010b), el pez híbrido *Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* (de Moura *et al.*, 2017) y *Brycon amazonicus* (Blasco *et al.*, 2021). Ruiz de Arcaute *et al.* (2018) también determinaron el aumento de GST en *C. decemmaculatus* después de la exposición aguda a los formulados de otros herbicidas (dicamba y 2,4 D).

El GSH desempeña un rol fisiológico esencial en el metabolismo y eliminación de tóxicos y también forma parte de la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo (Finkel y Holbrook, 2000; Van der Oost *et al.*, 2003). GSH actúa como cofactor de varias enzimas antioxidantes como la GST, por lo tanto, la presencia de contaminantes en los organismos puede generar la reducción de los niveles de GSH en las células, aumentando la susceptibilidad al estrés oxidativo (Abele *et al.*, 2012). El GSH, es uno de los principales tioles no proteico de las células, participa en la defensa celular contra la acción tóxica de oxirradicales. Zhang *et al.* (2004) han informado que, durante un estrés oxidativo moderado, los niveles de GSH en el hígado de los peces pueden incrementarse, como un mecanismo adaptativo, mediante una síntesis aumentada del mismo. El aumento de GSH podría indicar el incremento de su síntesis como respuesta al estrés para prevenir reacciones autooxidativas importantes (Schuliga *et al.*, 2002; Sinhorin *et al.*, 2014). Las

variaciones en el contenido de GSH celular se considera un indicador del grado y la duración de la exposición a contaminantes oxidantes en los peces (Dautremepuits *et al.*, 2009). La disminución de los niveles de GSH en el hígado, ha sido reportado previamente después de la exposición crónica (80 días) de *Oreochromis nicotilus* a 0,2 -16 mg PMG × L⁻¹ (Zheng *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en esta Tesis fueron similares a los documentados por otros autores en los que se informó el aumento de los niveles de GSH después de 96 h de exposición a formulados de PMG, en el pez híbrido *Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* (de Moura *et al.*, 2017) y en *Brycon amazonicus* (Blasco *et al.*, 2021).

Una de las consecuencias de la insuficiencia en los mecanismos de detoxificación es el aumento en la peroxidación lipídica, la cual es uno de los principales indicadores de estrés oxidativo (Cooke *et al.*, 2006) y puede generarse en diversos tejidos de los peces, tras la exposición a contaminantes, tales como los herbicidas (dos Santos Miron *et al.*, 2008). En este estudio no se observó un efecto en los procesos de peroxidación lipídica. Zheng *et al.* (2021) observaron un aumento significativo en los niveles de MDA en el hígado de *Oreochromis nicotilus* luego de la exposición crónica a 0,2 -16 mg PMG × L⁻¹. Algunos autores también han demostrado daño oxidativo a lípidos con el consiguiente aumento de la concentración de TBARS, en diferentes tejidos de peces después de la exposición a formulados comerciales de PMG: Modesto y Martínez (2010b) en *Prochilodus lineatus* y Falfushynska *et al.* (2021) en *Danio rerio*. Esta diferencia observada con los resultados de la presente Tesis puede deberse tanto a los distintos tiempos de exposición, como a una diferencia en la susceptibilidad de las especies.

3.6.2. Alteraciones de defensas antioxidantes, actividad de la enzima detoxificante glutatión-S-transferasa y marcadores de estrés oxidativo después de la exposición a clorpirifós.

A modo comparativo, dado que la vía de toxicidad del CPF principalmente está asociada a los efectos neurotóxicos mediante mecanismos directos, se evaluaron los efectos en los parámetros de estrés oxidativo y defensas antioxidantes luego de la exposición aguda a CPF.

Diferentes trabajos han informado variaciones en la actividad de CAT por efecto a la exposición a CPF. Sin embargo, estas respuestas dependen de las condiciones de la exposición y de la especie en estudio. El análisis de los resultados de la presente Tesis evidenció, como se mostró en la fracción anterior, un aumento significativo respecto al grupo control de la actividad CAT del 40% para $1 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y del 111% para $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$, a diferencia de la fracción media donde la actividad de esta enzima disminuyó en un 64% para la concentración más alta. Por otro lado, en la fracción posterior no presentaron ninguna alteración los niveles de las defensas antioxidantes con respecto al control. Esto podría estar indicando que en este tejido no hubo un exceso de producción de EROs, capaz de generar un cambio en el estado redox a nivel celular.

El aumento de la actividad de CAT en el cerebro concuerda con los resultados reportados por otros autores, Sharbidre *et al.* (2011) determinaron en *Poecilia reticulata* el aumento de la actividad de CAT después de la exposición a clorpirifós Terrashield 50 TC (formulado comercial) durante 96 h. El aumento significativo de CAT puede ser una respuesta adaptativa de los organismos al intentar neutralizar las EROs generadas por el contaminante. A diferencia de los resultados obtenidos en esta Tesis, otros autores han reportado la inhibición de esta enzima en el cerebro de diferentes especies de peces, después de la exposición aguda a clorpirifós y su formulado clorfox. Esto fue observado en *Carassius auratus* después de la exposición durante 96 h a $15,3 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Ma *et al.*, 2013) y en *C. interruptus* luego de la exposición durante 48 h a clorfox (Bonifacio *et al.*, 2017).

La disminución de la actividad de CAT en la fracción media coincide con los resultados informados por Kavitha y Venkateswara Rao, (2008) quienes determinaron una inhibición del 77% en esta fracción corporal de *Gambusia affinis*, después de la exposición a $297 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ durante 96 h. Ma *et al.* (2013) describen una inhibición de la actividad de CAT en el hígado de *Carassius auratus* después de la exposición a $15,3 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $51 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Bonifacio *et al.* (2017) observaron una inhibición en el hígado en ejemplares de *C. decemmaculatus* después de la exposición durante 48 h a Clorfox un formulado comercial de clorpirifós, y Palanikumar *et al.* (2014) en *Chanos chanos*.

En relación con los niveles de GSH y a la actividad de SOD, no se detectaron cambios por la exposición aguda a CPF. A diferencia de los resultados aquí obtenidos, algunas

investigaciones han informado cambios en estas defensas antioxidantes después de la exposición durante 96 h a concentraciones de CPF más altas que las ensayadas en esta Tesis. Kavitha y Venkateswara Rao (2008) informaron en *Gambusia affinis* (especie de la misma familia que *C. decemmaculatus*), en la fracción media, una inhibición de SOD después de la exposición a 294 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Mientras que Ma *et al.* (2013) determinaron en *Carassius auratus* una inhibición en la actividad de SOD en hígado y cerebro después de la exposición a 15,3 y 51 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Sharbidre *et al.* (2011) observaron en *Poecilia reticulata* aumento en los niveles de GSH y actividad de SOD en cerebro, hígado y branquias al ser expuestos al formulado de clorpirifós (Terrashield 50 TC).

En este estudio no se observó, en ninguna fracción corporal, un cambio de actividad de GST luego de la exposición a CPF. Estos resultados son similares con los reportados por otros autores después de la exposición a formulados comerciales de CPF. Bonifacio *et al.* (2017) no obtuvieron cambios en GST en *C. interruptus* frente a la exposición por 48 h a clorfox. Rendón-von Osten *et al.* (2005) tampoco detectaron cambios en la actividad de esta enzima en *Gambusia yucatana* (especie de la misma familia que *C. decemmaculatus*) después de la exposición por 96 h a Lorsban. Sin embargo, otros trabajos han reportado variaciones de la actividad de GST, como una respuesta de los organismos frente a la exposición a este insecticida. Jeon *et al.* (2016) observaron un aumento en el hígado de *Oryzias latipes*, después de la exposición durante 96 h a 200 y 500 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (concentraciones de CPF en un orden de magnitud mayores que las utilizadas en este trabajo). Mientras que Bonifacio *et al.* (2017) determinaron una leve disminución de la actividad de GST en el músculo (fracción posterior) de *C. decemmaculatus* después de la exposición a clorfox por 48 h, sin observar cambios en branquias ni hígado. Las diversas respuestas encontradas en bibliografía, en diferentes tejidos de peces expuestos a este insecticida y sus formulados comerciales, demuestran la variabilidad en la susceptibilidad de esta enzima según la especie, el tejido y tiempo de exposición.

En la fracción posterior no se observó ningún cambio en los niveles de las defensas antioxidantes, esto podría deberse a una menor concentración del CPF en esta fracción corporal. Algunos autores han informado, en peces, una concentración de CPF menor en la fracción posterior con respecto a otras fracciones corporales, después de la exposición a este insecticida. Bonansea *et al.* (2017) determinaron la concentración de CPF en diferentes tejidos de *Jenynsia multidentata* después de una exposición a 0,4 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$

durante 96 h, y afirmaron la presencia de este insecticida en el siguiente orden descendente: intestino> hígado> branquias> músculo. Se informó una distribución similar en *Gambusia affinis*, siendo mayor en viseras> cabeza> cuerpo después de la exposición durante 20 días al mismo insecticida (Rao *et al.*, 2005).

Por último, no se observaron cambios en los procesos de peroxidación lipídica. Otros autores han reportado daño oxidativo a lípidos después de la exposición a concentraciones más altas de CPF, a formulados comerciales o a un tiempo de exposición más prolongado. Kavitha y Venkateswara Rao (2008) informó el aumento de peroxidación lipídica en la fracción media de *Gambusia affinis*, después de la exposición durante 96 h a $297 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Xing *et al.* (2012) registraron el incremento de TBARS en hígado y branquias en *Cyprinus carpio* después de la exposición durante 40 días a 11,6 y $116 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Nunes *et al.* (2018) observaron después de 96 h el aumento de peroxidación lipídica en *Cyprinus carpio* y en *Danio rerio* expuestos a Colosso FC30 (formulado comercial de CPF).

En este estudio no se observaron cambios en los procesos de peroxidación lipídica, por exposición a los plaguicidas analizados. Por lo tanto, sobre la base de los resultados de esta Tesis no pudimos determinar que PMG y CPF generen daño oxidativo en *C. decemmaculatus* luego de la exposición aguda a estos plaguicidas en las condiciones ensayadas. Una hipótesis sería que ante la exposición a estos contaminantes un aumento de las EROs podría ser neutralizado mediante las defensas antioxidantes GST y GSH para PMG y CAT para CPF, impidiendo los efectos de estrés oxidativo. Sin embargo, no puede descartarse la existencia de daño a proteínas o a ADN. Otros autores han determinado en *C. decemmaculatus* efectos de daño al ADN después de la exposición aguda a formulados de los herbicidas dicamba y 2,4 D (Ruiz de Arcaute *et al.*, 2019).

Estos resultados sobre parámetros de defensas antioxidantes (CAT, GSH y SOD), alteraciones de la enzima detoxificante GST y el marcador de estrés oxidativo TBARS, después de la exposición aguda a PMG y CPF, son los primeros reportados para *C. decemmaculatus*. De esta manera, este trabajo resulta una contribución para la evaluación de los efectos de plaguicidas en esta especie nativa.

3.7. Conclusiones

Estos resultados denotan que las exposiciones subletales de *C. decemmaculatus* al insecticida CPF y al herbicida PMG, incluso a concentraciones ambientalmente relevantes ($5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$), producen un aumento de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas y alteraciones en la enzima detoxificante; no observándose efectos de daño oxidativo. Es de destacar que las defensas antioxidantes responden de manera variable ante la exposición a cada plaguicida (CAT para CPF, y GSH y GST para PMG), difiriendo además entre las distintas fracciones corporales. Esto estaría indicando que, si bien ambos tóxicos tienen el potencial para generar en *C. decemmaculatus* procesos de estrés oxidativo, modifican la actividad de algunas defensas antioxidantes de manera variable, posiblemente dependiendo de las vías de metabolización y del destino de los contaminantes.

Es relevante resaltar que todas estas respuestas se observaron para exposiciones agudas (96 h) poniendo en evidencia la sensibilidad en las respuestas de estos biomarcadores.

Finalmente, los resultados sugieren que las vías de estrés oxidativo podrían estar participando en la toxicidad asociada a la exposición tanto para CPF como para PMG. Para este último plaguicida se han determinado efectos neurotóxicos, pero se desconoce el mecanismo de toxicidad asociado, pudiendo las vías de estrés oxidativo estar involucradas.

Capítulo 4

Capítulo 4: Evaluación de los efectos de la exposición a contaminantes ambientales sobre parámetros de neurotoxicidad y estrés oxidativo en *Cnesterodon decemmaculatus*

4.1. Introducción

Como se mencionó anteriormente (Capítulo 1) el río Reconquista es uno de los cuerpos de agua más contaminados de Argentina y es un importante tributario del Río de la Plata, el cual provee de agua potable a la ciudad de Buenos Aires y alrededores. Durante varias décadas, este cuerpo de agua ha sido un punto de vertido de diferentes efluentes contaminados de origen urbano, agrícola e industrial (Salibián, 2006). En la cuenca media del Río Reconquista se encuentra la subcuenca Las Catonas (ver descripción detallada en el apartado 1.4.1 del Capítulo 1) estudiada en esta Tesis.

La evaluación de la calidad de los cuerpos de agua está considerada en los lineamientos de la Ley nacional 24051 de Residuos Peligrosos, en el decreto reglamentario 831/93 y la resolución 2423/93 establecidos por la Secretaría de Recursos Naturales y de Ambiente Humano. Sin embargo, los límites sugeridos en los niveles guía carecen de adaptaciones según las características de los cuerpos de agua del territorio nacional (Ferrari, 2015). Además, existe una gran variedad de posibles agentes contaminantes, su identificación y cuantificación es un trabajo extremadamente complejo. Frente a estas dificultades, diferentes autores han propuesto índices de la calidad del agua (ICAs) adaptados a las características locales o regionales de los sistemas acuáticos. Berón (1984) desarrolló un ICA para el estudio de la contaminación cloacal a partir de los parámetros fisicoquímicos, temperatura, cloruros, nitrógeno-amoniocal, DBO y OD.

Al realizar un estudio de la contaminación de un cuerpo de agua, el análisis fisicoquímico de los sitios puede no ser suficiente. El momento de muestreo implica la descripción del ambiente en un instante particular, pudiendo las variables fisicoquímicas mostrar variaciones temporales debido a fluctuaciones ambientales o vertidos puntuales.

Para evaluar el impacto ambiental de los plaguicidas, es necesario realizar análisis fisicoquímicos y toxicológicos (US EPA, 1993). Los análisis fisicoquímicos no proporcionan información sobre la toxicidad de las muestras ambientales, ya que pueden

ocurrir múltiples interacciones en la mezcla compleja de compuestos presentes en el ambiente, por lo que la detección de la toxicidad es fundamental en el momento de estudiar la contaminación ambiental (Ruiz *et al.*, 1997; Solomon y Sibley, 2002). Debido a que los efluentes son una fuente principal de entrada directa y continua de contaminantes en los ecosistemas acuáticos, el estudio de los efectos de la exposición a efluentes sobre los organismos, poblaciones o comunidades tiene una gran relevancia ecológica. Sin embargo, relacionar los efectos observados con contaminantes específicos o incluso clases de contaminantes sigue siendo una tarea muy difícil, debido a la composición generalmente desconocida, compleja y a menudo variable de los efluentes (Smolders *et al.*, 2004). En este sentido, los bioensayos se vuelven necesarios para la evaluación de los efectos agudos y crónicos de las emisiones de sustancias químicas peligrosas. Diferentes estudios ecotoxicológicos han utilizado las muestras ambientales para realizar bioensayos tanto agudos como crónicos *in situ* y en laboratorio, para evaluar la contaminación ambiental de un cuerpo de agua (Farré y Barceló 2003; Smolders *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2021) y para una mejor aproximación de estos contaminantes se han empleado diferentes biomarcadores.

La importancia de utilizar biomarcadores a diferentes niveles de respuesta biológica en peces ha sido señalada por diferentes autores como una herramienta para la “detección temprana” de los efectos biológicos y por ello se han incorporado en diversos programas de biomonitoring ambiental (Ruvinda y Pathiratne, 2018; Vieira *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021). Un biomarcador muy utilizado para evaluar el efecto de los contaminantes es la actividad de la enzima AChE debido a su sensibilidad después de la exposición a algunos compuestos como los OPs, la misma es considerada un buen biomarcador de neurotoxicidad (Lionetto *et al.*, 2013) (ver descripción en el apartado 2.1.2.1 del Capítulo 2). Estudiar la inhibición de la actividad de AChE, no solo permite evidenciar la presencia de contaminantes, sino también si la dosis de la exposición es suficiente para alcanzar el sitio diana y occasionar efectos fisiológicos (Fulton y Key, 2001). Por otra parte, la exposición a contaminantes ambientales puede generar un desbalance redox celular entre moléculas de alto potencial oxidante derivadas del oxígeno (especies reactivas de oxígeno, EROs) y las defensas antioxidantes, occasionando finalmente daño sobre macromoléculas de vital importancia (ver apartado 3.1.3 y 3.1.4 del Capítulo 3). Algunos autores han utilizado diferentes parámetros de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas y biomarcadores de estrés oxidativo en diferentes especies de peces que

habitan cuerpos de agua contaminados, para evidenciar alteraciones de distinto carácter que pueden afectar las funciones básicas de estos organismos (Stoliar y Lushchak, 2012; Birnie-Gauvin *et al.*, 2017; Baudou *et al.*, 2019).

Se han desarrollado diferentes trabajos de investigación en otros sitios de muestreo del río Reconquista, en los que se han estudiado las características fisicoquímicas y se han realizado bioensayos de toxicidad crónica y aguda en anfibios y peces tanto *in situ* como en laboratorio (García *et al.*, 1998; Ossana *et al.*, 2016; Ferro *et al.*, 2019). Tanto en la cuenca media como en la cuenca alta del río Reconquista se han informado niveles leves de contaminación (Rigacci *et al.*, 2013) y, paralelamente, se han descripto condiciones de estrés en renacuajos de *L. catesbeianus* (Ossana *et al.*, 2013). Particularmente dentro de la familia de peces Poeciliidae, la especie *Cnesterodon decemmaculatus*, empleada como organismo de ensayo en el desarrollo de esta Tesis, ha sido utilizada en diferentes estudios de biomonitordeo ambiental (Ferrari *et al.*, 1998; de la Torre *et al.*, 2005; Mastrángelo y Ferrari, 2013) y se ha reportado daño en ADN después de la exposición a agua de esta cuenca (Baudou *et al.*, 2019). En este contexto, el objetivo de este Capítulo fue evaluar el efecto neurotóxico y sobre parámetros de estrés oxidativo en *C. decemmaculatus*, después de la exposición a muestras ambientales de agua de la subcuenca Las Catonas.

4.2. Hipótesis

La exposición en condiciones de laboratorio al agua superficial de la subcuenca Las Catonas en áreas aledañas a zonas con actividad residencial, agrícola e industrial, induce en *Cnesterodon decemmaculatus* efectos neurotóxicos, alteraciones en las defensas antioxidantes y estrés oxidativo.

4.3. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la exposición a muestras ambientales de aguas de la subcuenca Las Catonas (Cuartel V, Partido de Moreno) sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en un teleósteo nativo, *C. decemmaculatus*
- Analizar parámetros de estrés oxidativo, alteraciones en los niveles de las defensas antioxidantes en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a muestras ambientales de aguas de la subcuenca Las Catonas.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Organismo de ensayo: *Cnesterodon decemmaculatus*

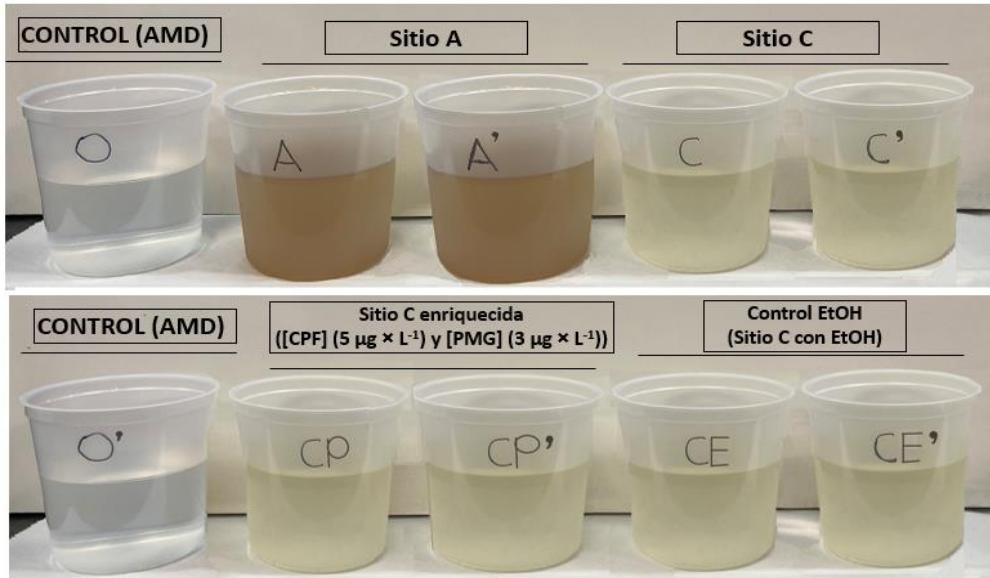
Se colectaron ejemplares adultos de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) de ambos sexos, en el estanque de la estación hidrobiológica de Chascomús, que se considera con bajo impacto antrópico. Para evaluar la calidad del agua del sitio de colecta, se midieron parámetros fisicoquímicos, se identificó y cuantificó la presencia de metales y plaguicidas. *In situ* se realizaron mediciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto (OD) y conductividad eléctrica y en el laboratorio se determinó la turbidez, alcalinidad, dureza, iones conservativos, nutrientes, metales y plaguicidas (en el Capítulo 1 se describió la metodología utilizada).

Una vez que los peces fueron capturados, se mantuvieron en agua obtenida del sitio de captura y fueron trasladados al Bioterio de Animales No Tradicionales (BANT) de la FCEyN-UBA. Allí los animales fueron colocados en peceras de vidrio con agua proveniente del lugar de captura en condiciones de temperatura y luz controladas ($23,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12L:12O), aireación constante, y alimentación con comida comercial Tetra Fin® finamente molida. Posteriormente, cada 24 h se reemplazó el 10% del agua proveniente del lugar de origen por agua moderadamente dura (AMD, preparada según US EPA, 1993; ver Capítulo 2); hasta reemplazar el 100% de la misma

4.4.2. Bioensayo agudo de exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas para la determinación de efectos sobre parámetros biomarcadores en *C. decemmaculatus*

Se recolectaron muestras ambientales de agua del arroyo La Catonas (Cuartel V, Partido de Moreno), del Sitio A y Sitio C y fueron conservadas en frío (4°C) previo a dar inicio al bioensayo (dentro de las 24 h de la recolección de las muestras). Se utilizaron 5 medios de exposición, con sus respectivas replicas: 1) Control: agua moderadamente dura (AMD); 2) Sitio A: muestra ambiental proveniente del Sitio A (sitio de bajo impacto, cercano a zona residencial); 3) Sitio C: muestra ambiental proveniente del Sitio C (aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a zona hortícola); 4) Sitio C enriquecida: muestra ambiental del Sitio C a la que se le agregó una concentración conocida de CPF (5 µg CPF x L⁻¹) y PMG (3 µg PMG x L⁻¹) (equivalentes a las mayores concentraciones de estos plaguicidas identificadas en los muestreros previos); 5) Control EtOH: muestra ambiental del Sitio C, con el agregado de la concentración de etanol utilizada como solvente en el último tratamiento (EtOH 5 x 10⁻⁴ % (v/v). En la Figura 67 se describe el diseño experimental utilizado.

5 hembras (tamaño homogéneo) por recipiente.
 Medio AMD (pH = 7,4–7,8; dureza 80–100 mg CaCO₃ × L⁻¹, alcalinidad 60–70 mg CaCO₃ × L⁻¹).
 Aclimatación previa a 48 h en cámara.
 Exposición a concentraciones subletales.



- 96 h de exposición
- Sin alimentación
- Sin aireación
- Recambio de medio a las 48 h

Figura 67. Diseño experimental utilizado en los ensayos de exposición *in vivo* de *C. decemmaculatus* a muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas.

Las muestras ambientales fueron homogenizadas y llevadas a temperatura ambiente antes de iniciar los bioensayos. Las soluciones correspondientes a los tratamientos 4 y 5 se prepararon inmediatamente antes de dar inicio al bioensayo. La solución enriquecida en CPF (5 µg CPF × L⁻¹) y PMG (3 µg PMG × L⁻¹) del tratamiento 4 se preparó a partir de una solución madre de 1.000 mg CPF × L⁻¹ en etanol y de una de 200 mg PMG × L⁻¹ (la cual se sonicó para garantizar la total disolución de los plaguicidas), utilizando el volumen necesario de cada una para obtener el agregado de las concentraciones descriptas, por dilución con agua de la muestra ambiental del Sitio C. Se verificó y se ajustó el pH con NaOH 4 M, de tal manera que coincidiera con los valores de la muestra del Sitio C.

Se distribuyeron 3-4 hembras del stock de peces de aproximadamente 2,7 cm de longitud total en cada uno de los recipientes, de material plástico inerte de polipropileno, conteniendo 500 mL de AMD, preparado según protocolo US EPA (1993) (ver descripción en el Capítulo 2 apartado 2.4.2.1). Los peces fueron alimentados hasta las 24 h previas al

bioensayo. Una vez preparadas las soluciones, a cada uno de los recipientes que contenían los peces se le asignó, al azar, un tratamiento con su respectivo duplicado. Los recipientes fueron parcialmente cubiertos, para minimizar la evaporación y mantener las concentraciones de las soluciones experimentales relativamente constantes a lo largo del ensayo, y se renovaron completamente después de 48 h de inicio de la exposición. Se tomaron alícuotas de todas las soluciones y se determinó en todos los medios el pH, OD y conductividad a t_0 , t_{48h} previo y posterior al recambio y t_{96h} . Las alícuotas se conservaron a -20°C, para la posterior determinación de las concentraciones de los plaguicidas. A la vez, el diseño experimental involucró que se realizaran en paralelo dos sets de tratamientos, equivalentes al que se muestra en la Figura 67 (cada uno con sus duplicados), uno destinado a las determinaciones realizadas en homogenatos preparados en buffers con Tx100 y otro para aquellas correspondientes a los sin Tx100.

4.4.3. Preparación de homogenatos y determinación de biomarcadores de defensas antioxidantes y de estrés oxidativo.

Finalizado el tiempo de exposición (96 h) se prepararon homogenatos de la fracción anterior, media y posterior de las hembras utilizadas en el bioensayo, siguiendo la metodología utilizada en el Capítulo 3 (ver apartado 3.4.3). En los mismos, se determinó el contenido de proteínas, actividad de AChE (ver Capítulo 2, apartado 2.4.4.1), parámetros de defensas antioxidantes (CAT, SOD y GSH), marcadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica (TBARS) y actividad de la enzima detoxificante (GST). En la fracción anterior se determinó: AChE, TBARS, GST, SOD, CAT y GSH; en fracción media: TBARS, GST, SOD, CAT y GSH y en la fracción posterior: GST, SOD y GSH. La metodología utilizada en la determinación de parámetros de defensas antioxidantes, marcadores de estrés oxidativo y actividad de la enzima detoxificante se describió en el Capítulo 3, apartado 3.4.4. Cuando el peso de las fracciones era tal que el volumen de homogenato resultaría insuficiente para realizar las determinaciones individuales programadas, se prepararon los homogenatos juntando los tejidos correspondientes a dos ejemplares pertenecientes al mismo tratamiento.

4.4.4. Análisis estadístico

Los parámetros se informaron indicando la media \pm ESM (n = número de valores promediados). Para la comparación de la actividad de AChE y de los niveles de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, entre los tratamientos y el grupo control, se aplicó el test ANOVA unifactorial. Se empleó el test de SHAPIRO-WILK para el estudio de normalidad y el test de LEVENE'S para el estudio de la homogeneidad de las varianzas. Además, se valió del test de TUKEY para la evaluación de la media y se aplicó el análisis de Kruskal Wallis para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad y homocedasticidad y el post test Dunns.

La calidad del agua se evaluó utilizando el ICA (Berón, 1984), este índice puede variar de 0 a 10 según el grado de contaminación, donde 10 corresponde a un cuerpo de agua prístico, los valores entre 8-10 contaminación leve, entre 6-8 contaminación intermedia, entre 3-6 contaminación elevada, y entre 0-3 contaminación muy elevada, considerándose al valor 0 como indicativo de calidad de agua semejante a una descarga cloacal y doméstica.

4.5. Resultados

4.5.1. Parámetros fisicoquímicos, cuantificación de plaguicidas, metales y calidad del agua en las muestras ambientales

Los parámetros fisicoquímicos, niveles de metales, plaguicidas e índices de calidad del agua del estanque de la estación hidrobiológica de Chascomús, y de las muestras ambientales provenientes de la subcuenca las Catonas, correspondiente al Sitio A y Sitio C, se muestran en las Tablas 29 y 30, respectivamente.

Tabla 29. Determinación de parámetros fisicoquímicos, cuantificación de plaguicidas y metales de las muestras del agua superficial del estanque de la estación hidrológica de Chascomús, lugar donde se colectaron los peces.

Parámetro FQ	Estanque Chascomús	Niveles guía*
Temperatura de agua (°C)	$21,5 \pm 0,5$	
Conductividad ($\mu\text{s} \times \text{cm}^{-1}$)	12238 ± 102	
Oxígeno Disuelto (mg $\text{O}_2 \times \text{L}^{-1}$)	$12,69 \pm 0,01$	
pH	$8,0 \pm 0,1$	
Alcalinidad (mg $\text{CaCO}_3 \times \text{L}^{-1}$)	727 ± 1	
Dureza (mg $\text{CaCO}_3 \times \text{L}^{-1}$)	1310 ± 10	
Nitrito (mg $\text{NO}_2^- \times \text{L}^{-1}$)	$0,176 \pm 0,002$	0,06
Nitrato (mg $\text{NO}_3^- \times \text{L}^{-1}$)	$14,83 \pm 0,66$	
Amonio (mg $\text{NH}_4^+ \times \text{L}^{-1}$)	$0,026 \pm 0,001$	1,37
Fósforo inorgánico (mg $\text{PO}_4^{3-} \times \text{L}^{-1}$)	$0,30 \pm 0,01$	
Turbidez NTU	14 ± 1	
Cloruros (mg $\text{Cl}^- \times \text{L}^{-1}$)	1778 ± 23	
DBO₅ (mg $\text{O}_2 \times \text{L}^{-1}$)	$2,5 \pm 5$	
DQO (mg $\text{O}_2 \times \text{L}^{-1}$)	50 ± 3	
Metales	Estanque Chascomús	Niveles guía*
Aluminio ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	5
Zinc ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	30
Hierro ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	$32,4 \pm 0,3$	
Níquel ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	$0,11 \pm 0,02$	25
Cobre ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	2
Cromo ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	$0,07 \pm 0,05$	2
Arsénico ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	$15,3 \pm 0,5$	50
Selenio ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	$0,09 \pm 0,01$	1
Cadmio ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	0,2
Mercurio ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	
Plomo ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	1
Plaguicidas		
[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	
[PMG] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	<0,5	
Índices de la Calidad de Aguas		
ICA (Berón 1984)		8,2

ICA Índice de Calidad del Agua, Berón 1984; (*) Niveles guía de calidad de agua para la protección de la vida acuática en agua superficial, Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina, Decreto 831/93 (LRPA, 1993). En negrita se resaltan los niveles que se encuentran por encima de los establecidos por dicha ley.

Los niveles de nítrito superaron los valores establecidos por la Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina para la protección de la vida acuática (LRPA, 1993). Las concentraciones de metales no superaron en ninguno de los casos los valores establecidos por esta ley. Teniendo en cuenta el índice ICA (Berón 1984), la calidad del agua en el estanque de la Estación Hidrobiológica de Chascomús corresponde a contaminación leve (ICA = 8,2).

Tabla 30. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua de la subcuenca Las Catonas (Cuartel V, Partido Moreno) con las que se realizó el bioensayo de exposición.

Parámetro FQ	Sitio A	Sitio C	Niveles guía*
Temperatura de agua (TCº)	22,8 ± 1,6	17,9 ± 0,9	
Conductividad (μs × cm⁻¹)	425 ± 15	1215 ± 5	
Oxígeno Disuelto (mg O₂ × L⁻¹)	7,9 ± 0,1	7,3 ± 0,1	
Ph	7,1 ± 0,3	7,8 ± 0,1	
Alcalinidad (mg CaCO₃ × L⁻¹)	181 ± 1	445 ± 5	
Dureza (mg CaCO₃ × L⁻¹)	79,5 ± 0,5	143 ± 1	
Nitrito (mg NO₂⁻ × L⁻¹)	0,015 ± 0,002	7,258 ± 0,033	0,06
Nitrato (mg NO₃⁻ × L⁻¹)	0,66 ± 0,22	10,18 ± 0,05	
Amonio (mg NH₄⁺ × L⁻¹)	0,06 ± 0,01	3,28 ± 0,06	1,37
Fósforo inorgánico (mg PO₄³⁻ × L⁻¹)	0,24 ± 0,02	9,00 ± 0,01	
Turbidez NTU	104 ± 1	56 ± 1	
Cloruros (mg Cl⁻ × L⁻¹)	20,80 ± 0,01	99,57 ± 0,01	
DBO₅ (mg O₂ × L⁻¹)	2,5 ± 5	9 ± 5	
Metales	Sitio A	Sitio C	Niveles guía* (μg × L⁻¹)
Aluminio (μg × L⁻¹)	86,2 ± 0,1	120,1 ± 0,1	5
Zinc (μg × L⁻¹)	<0,5	63,2 ± 0,3	30
Hierro (μg × L⁻¹)	162 ± 1	450 ± 1	
Níquel (μg × L⁻¹)	2,56 ± 0,02	2,99 ± 0,03	25
Cobre (μg × L⁻¹)	1,58 ± 0,01	3,26 ± 0,04	2
Cromo (μg × L⁻¹)	0,34 ± 0,02	0,63 ± 0,03	2
Arsénico (μg × L⁻¹)	38,2 ± 0,4	38,6 ± 0,3	50
Selenio (μg × L⁻¹)	0,27 ± 0,01	1,79 ± 0,02	1
Cadmio (μg × L⁻¹)	1,11 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,2
Mercurio (μg × L⁻¹)	<0,5	<0,5	
Plomo (μg × L⁻¹)	0,97 ± 0,02	2,54 ± 0,03	1
Plaguicidas			
[CPF] (μg × L⁻¹)	<0,5	4,02	
[PMG] (μg × L⁻¹)	<0,5	1,48	
Índices de la Calidad del agua			
ICA (Berón 1984)	6	5,4	

ICA: Índice de Calidad del Agua, Berón 1984; (*) Niveles guía de calidad de agua para la protección de la vida acuática en agua superficial, Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina. Decreto 831/93 (LRPA, 1993). **Sitio A:** tributario aguas arriba, cercano a zona residencial. **Sitio C:** aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. En negrita se resaltan los niveles que se encuentran por encima de los establecidos por la Ley N°24051.

Las concentraciones de nitrito y amonio del Sitio C superaron los valores establecidos por la Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina para la protección de la vida acuática (LRPA,1993). Teniendo en cuenta los niveles de metales propuestos por esta misma entidad reguladora, se identificó por encima de los niveles guía las concentraciones de zinc, cobre, selenio y plomo en el Sitio C y aluminio del Sitio A y C. El ICA evidenció que el Sitio A se encuentra entre el límite de contaminación intermedia y contaminación elevada (ICA = 6) y el Sitio C corresponde a contaminación elevada (ICA = 5,4). En cuanto a los plaguicidas, en el Sitio A no se observó la presencia de CPF ni de PMG, a diferencia del Sitio C donde se identificó $4,02 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $1,48 \mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$.

4.5.2. Efecto de exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas sobre parámetros biomarcadores en *C. decemmaculatus*.

En la Tabla 31 se describen los parámetros morfométricos de los peces utilizados.

Tabla 31. Parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (Pc), Factor de condición (K)) de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos a muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = animales por tratamiento) para los dos sets correspondientes a los diferentes biomarcadores analizados.

Tratamiento	n	L_T (cm)	Pc (mg)	K		Biomarcadores analizados
Control	7	$2,68 \pm 0,06$	136 ± 9	$0,70 \pm 0,03$	Homogenatos con Tx100	CAT y GSH
Sitio A	7	$2,64 \pm 0,02$	130 ± 13	$0,69 \pm 0,05$		
Sitio C	6	$2,65 \pm 0,03$	122 ± 4	$0,66 \pm 0,02$		
Control EtOH (Sitio C+EtOH)	8	$2,59 \pm 0,03$	104 ± 6	$0,59 \pm 0,02$		
Sitio C enriquecida	8	$2,58 \pm 0,02$	109 ± 4	$0,63 \pm 0,01$	Homogenatos sin Tx100	AChE, GST, SOD y TBARS
Control	7	$2,67 \pm 0,06$	133 ± 6	$0,70 \pm 0,03$		
Sitio A	7	$2,66 \pm 0,04$	139 ± 8	$0,73 \pm 0,02$		
Sitio C	8	$2,61 \pm 0,04$	127 ± 6	$0,71 \pm 0,02$		
Control EtOH (Sitio C+EtOH)	8	$2,62 \pm 0,03$	119 ± 5	$0,66 \pm 0,02$	Homogenatos sin Tx100	AChE, GST, SOD y TBARS
Sitio C enriquecida	7	$2,60 \pm 0,03$	118 ± 8	$0,67 \pm 0,01$		

Control: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A:** tributario aguas arriba, cercano a zona residencial; **Sitio C:** aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola; **Control EtOH:** agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecida:** agua del Sitio C enriquecida con $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $3 \mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$.

Los valores morfométricos de talla, peso y factor de condición entre el grupo control y los tratamientos no presentaron diferencias significativas. La mortalidad promedio del grupo

control fue del 0%, al igual que para los grupos expuestos a Sitio A, Sitio C, Control EtOH; mientras que para la exposición a la muestra Sitio C enriquecida fue del 6,25%.

4.5.2.1. Evaluación del efecto de la exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *C. decemmaculatus*

En la Figura 68 se grafica la actividad de AChE después de la exposición aguda (96 h) a muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas (Sitio A y Sitio C).

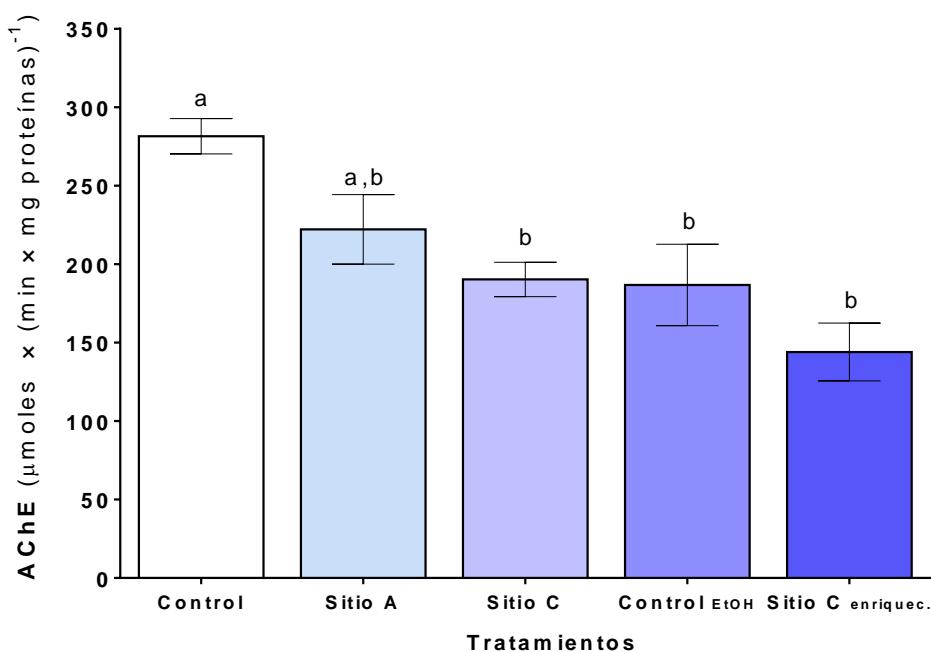


Figura 68. Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en homogenatos de la fracción anterior de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas a cinco tratamientos (control y muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas): **Control**: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A**: tributario aguas arriba, cercano a zona residencial; **Sitio C**: aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola; **Control EtOH**: agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecida**: agua del Sitio C enriquecida con 5 μg CPF $\times \text{L}^{-1}$ y 3 μg PMG $\times \text{L}^{-1}$. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=5-6). Barras que no presentan letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; $p<0,05$

La actividad específica promedio de AChE del grupo control fue de 281 U ($\text{U} = \mu\text{moles} \times (\text{min} \times \text{mg proteinas})^{-1}$). Se observó una disminución estadísticamente significativa del 32% en los organismos expuestos a la muestra ambiental del Sitio C, del 34% en el Control EtOH y del 49% para la exposición a la muestra del Sitio C enriquecida con CPF (5 μg CPF $\times \text{L}^{-1}$) y PMG (3 μg PMG $\times \text{L}^{-1}$). No se observaron diferencias significativas de la

actividad de AChE entre los tratamientos con el agua del Sitio C y Control EtOH (agua del Sitio C con EtOH).

4.5.2.2. Efecto de la exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas sobre parámetros de estrés oxidativo en *C decemmaculatus*

4.5.2.2.1. Actividad de catalasa

La actividad de CAT de los grupos control en la fracción anterior fue $8,01 \pm 0,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ y $20,37 \pm 1,77 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ en la fracción media. En la Figura 69 se grafican los valores obtenidos para los grupos control y los diferentes tratamientos expuestos a muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas.

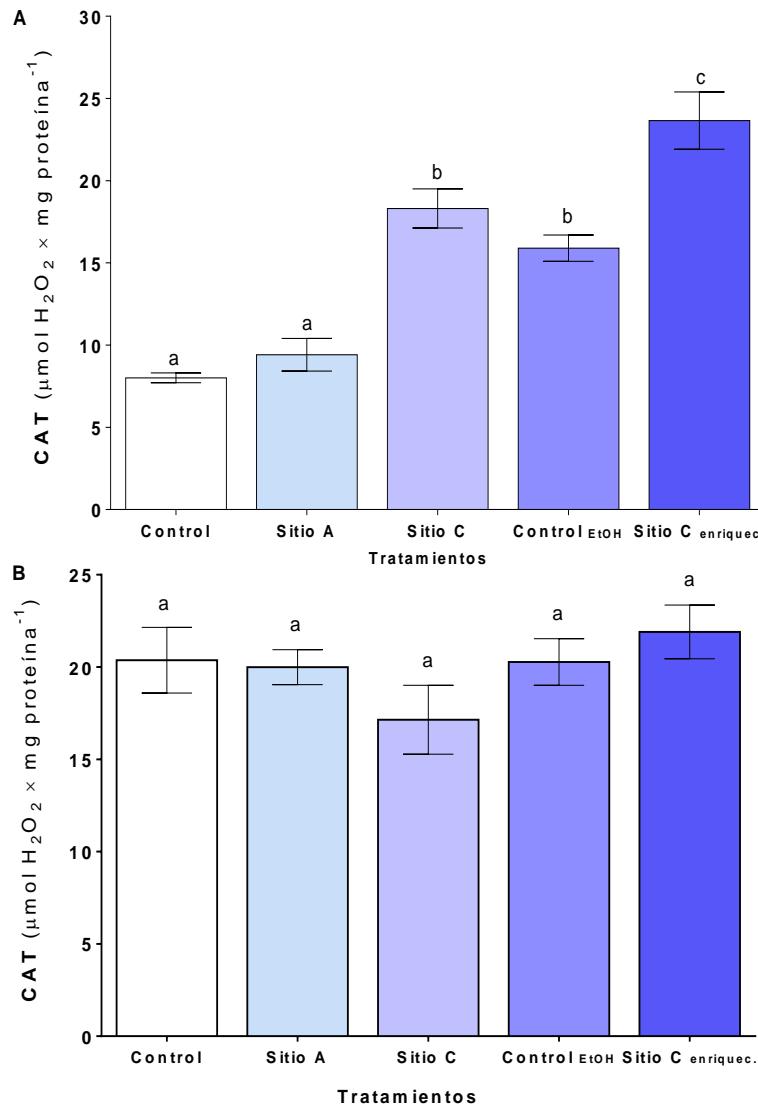


Figura 69. Actividad de catalasa (CAT) en fracciones corporales de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas a cinco tratamientos (control y muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas): **Control**: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A**: tributario aguas arriba, cercano a zona residencial, **Sitio C**: aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. **Control EtOH**: agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecida**: agua del Sitio C enriquecida con 5 μ g CPF \times L $^{-1}$ y 3 μ g PMG \times L $^{-1}$. **A**: Fracción anterior. **B**: Fracción media. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=5-6). Barras que no presentan letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; p<0,05.

No se observaron diferencias significativas de la actividad de CAT ni en la fracción anterior ni en la posterior, por el tratamiento con aguas del Sitio C o del Control EtOH. En la fracción anterior la actividad de CAT presentó un aumento significativo del 129% en los organismos expuestos al agua del Sitio C; del 98% para la exposición al Control EtOH y del 195% para

la exposición al agua del Sitio C enriquecida con CPF y PMG. Se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento con agua del Sitio C y del Sitio C enriquecida. En la fracción media no se observó cambio en la actividad de CAT en ninguno de los tratamientos.

4.5.2.2. Niveles de glutatióñ total

El valor promedio del contenido de t-GSH en los controles fue $7,42 \pm 0,60$ nmol \times mg proteína $^{-1}$ en la fracción anterior, $9,58 \pm 0,38$ nmol \times mg proteína $^{-1}$ en la fracción media y $11,02 \pm 0,80$ nmol \times mg proteína $^{-1}$ en la posterior. En la Figura 70 se grafican los valores obtenidos para los grupos control y los diferentes tratamientos expuestos a muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas.

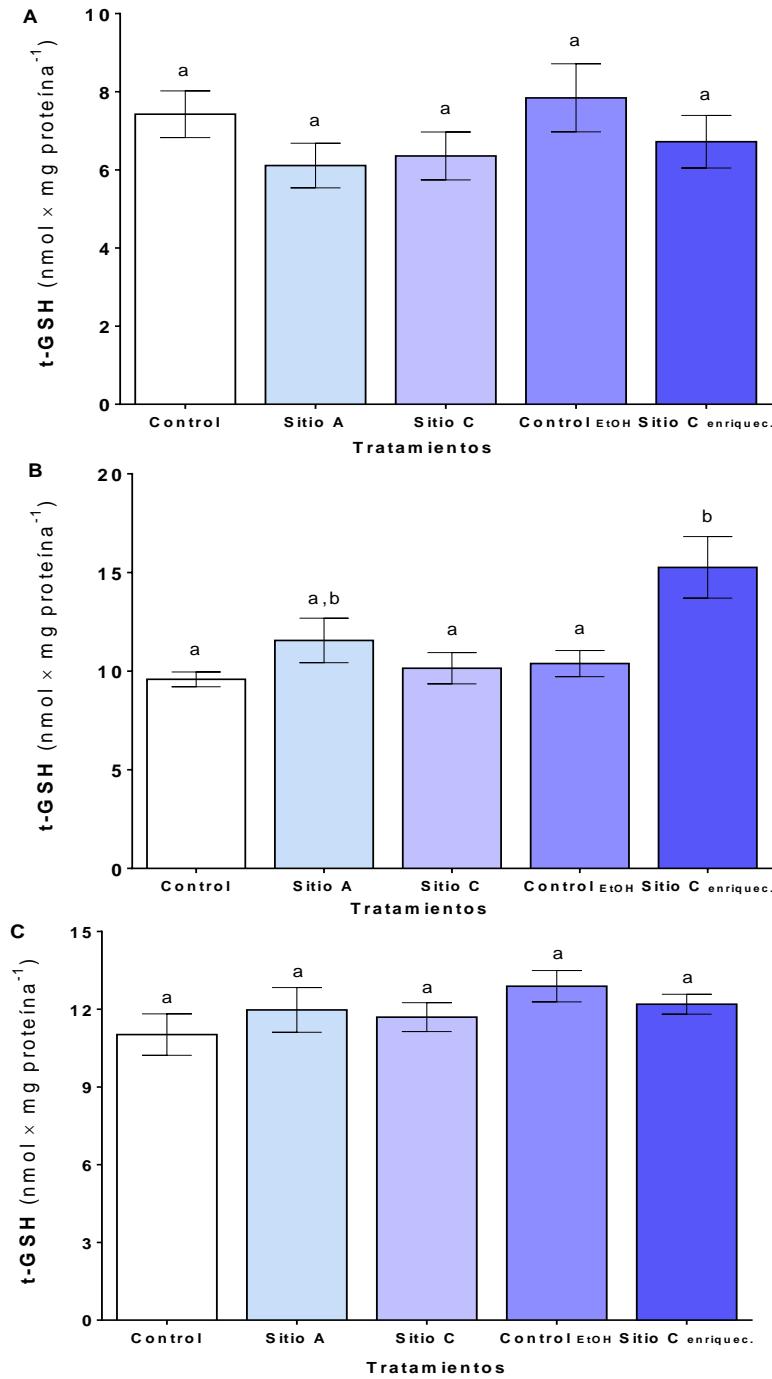


Figura 70. Contenido de glutatión total (t-GSH) en fracciones corporales de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas a cinco tratamientos (control y muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas): **Control**: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A**: tributario aguas arriba, cercano a zona residencial, **Sitio C**: aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. **Control EtOH**: agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecida**: agua del Sitio C enriquecida con 5 μ g CPF x L⁻¹ y 3 μ g PMG x L⁻¹. **A**: Fracción anterior. **B**: Fracción media. **C**: Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=5-6). Barras que no presentan letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; p<0,05

Se evidenció un incremento estadísticamente significativo del 59% en la fracción media para el grupo expuesto a aguas del Sitio C enriquecida con CPF ($5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$) y PMG ($3 \mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$). Además, se observó diferencias entre los tratamientos Sitio C y Sitio C enriquecida. En la fracción anterior y posterior no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. No se observaron diferencias significativas en el contenido de GSH entre el agua del Sitio C y el del Control EtOH.

4.5.2.2.3. Actividad de glutatión-S-transferasa

La actividad promedio de GST fue $0,075 \pm 0,008 \mu\text{mmol} \times \text{mg proteína}^{-1}$ en la fracción anterior; $0,021 \pm 0,002 \mu\text{mmol} \times \text{mg proteína}^{-1}$ en la fracción media y $0,020 \pm 0,002$ en fracción posterior. En la Figura 71 se grafican los resultados obtenidos para la actividad de GST de los grupos control y los diferentes tratamientos expuestos a muestras de agua de la subcuenca Las Catonas.

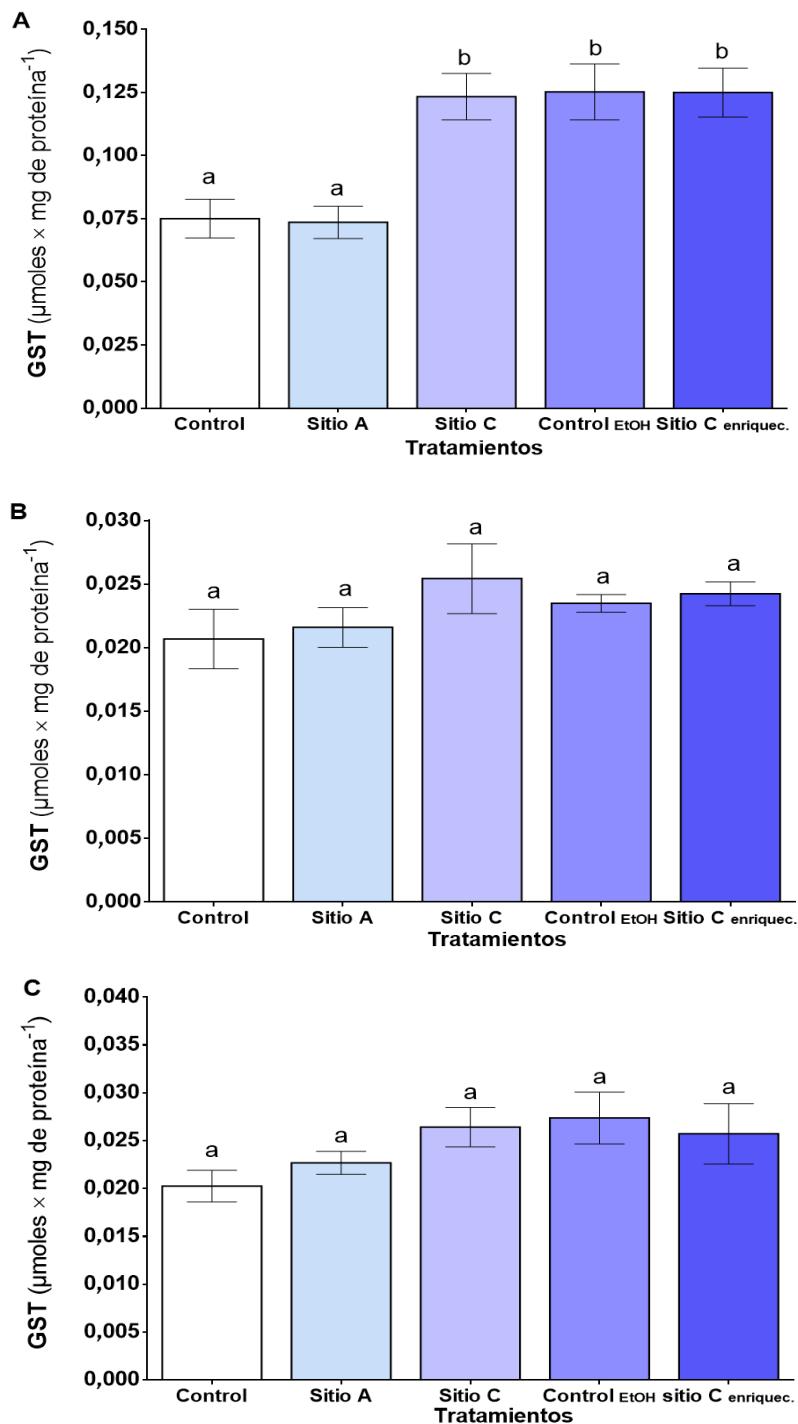


Figura 71. Actividad de glutación-S-transferasa (GST) en fracciones corporales de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas a cinco tratamientos (control y muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas): **Control**: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A**: tributario aguas arriba, cercano a zona residencial, **Sitio C**: aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. **Control EtOH**: agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecida**: agua del Sitio C enriquecida con $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $3 \mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$. **A**: Fracción anterior. **B**: Fracción media. **C**: Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=5-6$). Barras que no presentan letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; $p<0,05$

En la fracción anterior se determinó un aumento de la actividad de GST que resultó estadísticamente significativa, del 64% para la exposición a agua del Sitio C, del 67% para el agua Control EtOH y del 66% para el agua del Sitio C enriquecida con CPF y PMG, mientras que no se obtuvieron diferencias entre Sitio C y Sitio C enriquecida. En la fracción corporal media y posterior no se obtuvieron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos. No se observaron diferencias significativas en la actividad de GST entre los resultados obtenidos con el agua del Sitio C y la del Sitio C con EtOH.

4.5.2.2.4. Actividad de superóxido dismutasa

La actividad de SOD en los controles fue de $10,36 \pm 1,24 \text{ U} \times \text{mg proteína}^{-1}$ (fracción anterior); $22,78 \pm 2,03 \text{ U} \times \text{mg proteína}^{-1}$ (fracción media) y $4,70 \pm 0,51 \text{ U} \times \text{mg proteína}^{-1}$ (fracción posterior). En la Figura 72 se muestran los resultados de SOD obtenidos en las diferentes fracciones corporales, después de la exposición al agua de la subcuenca Las Catonas.

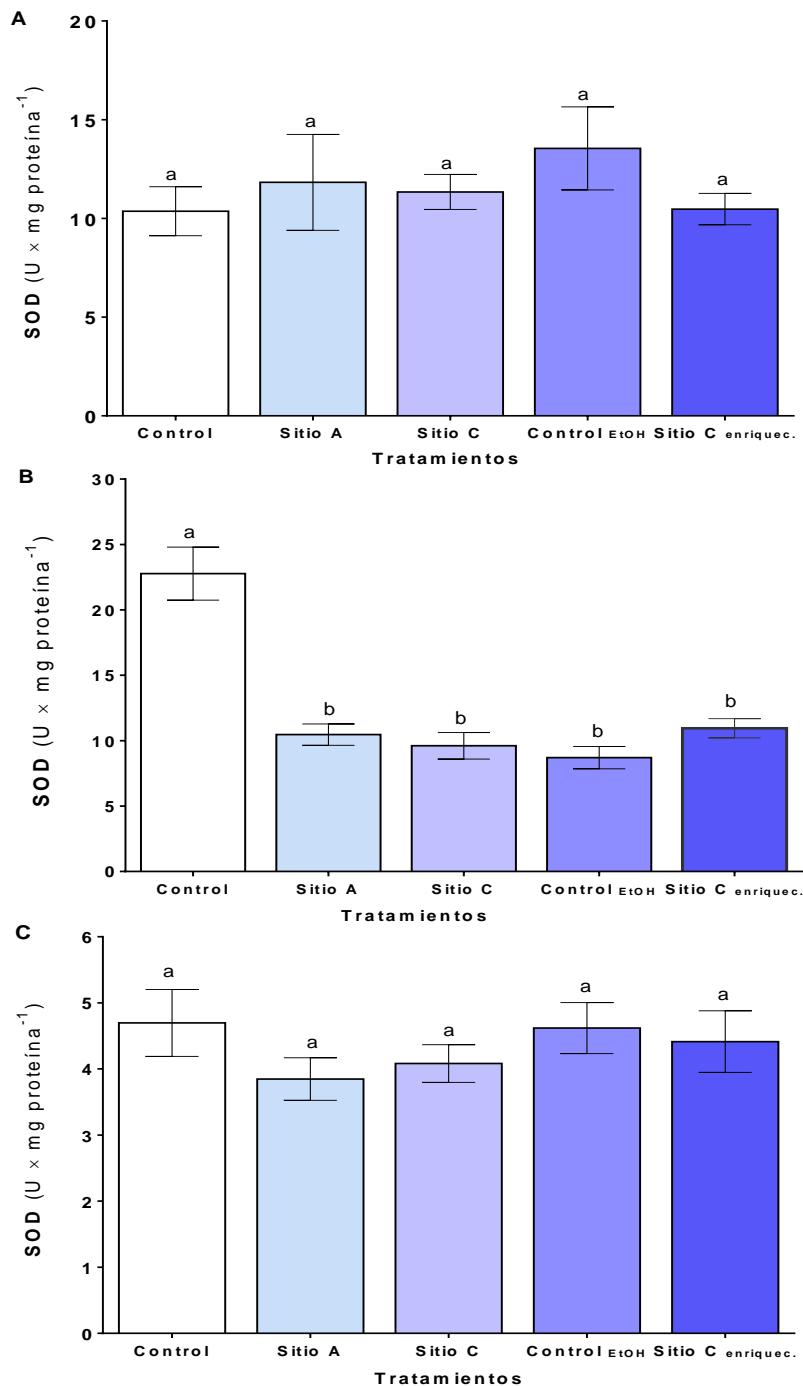


Figura 72. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en fracciones corporales de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas a cinco tratamientos (control y muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas): **Control**: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A**: tributario aguas arriba, cercano a zona residencial, **Sitio C**: aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. **Control EtOH**: agua del Sitio C con $5 \times 10^{-4} \text{ % EtOH}$ y **Sitio C enriquecida**: agua del Sitio C enriquecida con $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y $3 \mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$. **A**: Fracción anterior. **B**: Fracción media. **C**: Fracción posterior. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n=5-6$). Barras que no presentan letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; $p<0,05$

En la fracción corporal media, la actividad de SOD disminuyó el 54% después de la exposición a muestras de agua del Sitio A; el 58% para el Sitio C; el 62% para el Control EtOH y el 52% para el Sitio C enriquecida con CPF y PMG. No se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos Sitio C y Sitio C enriquecida. En la fracción anterior y posterior no se obtuvieron diferencias significativas con ninguno de los diferentes tratamientos. Tampoco se observaron diferencias significativas en la actividad de SOD para los tratamientos con el agua del Sitio C y el Control EtOH.

4.5.2.2.5. Estimación de los niveles de peroxidación lipídica (contenido de TBARS)

Los niveles de TBARS en los grupos control fue: $0,80 \pm 0,07 \text{ nmol} \times \text{mg proteína}^{-1}$ en la fracción anterior y $4,46 \pm 0,45 \text{ nmol} \times \text{mg proteína}^{-1}$ en fracción media. En la Figura 73 se grafican los valores de TBARS obtenidos para los grupos control y los grupos expuestos al agua de la subcuenca Las Catonas.

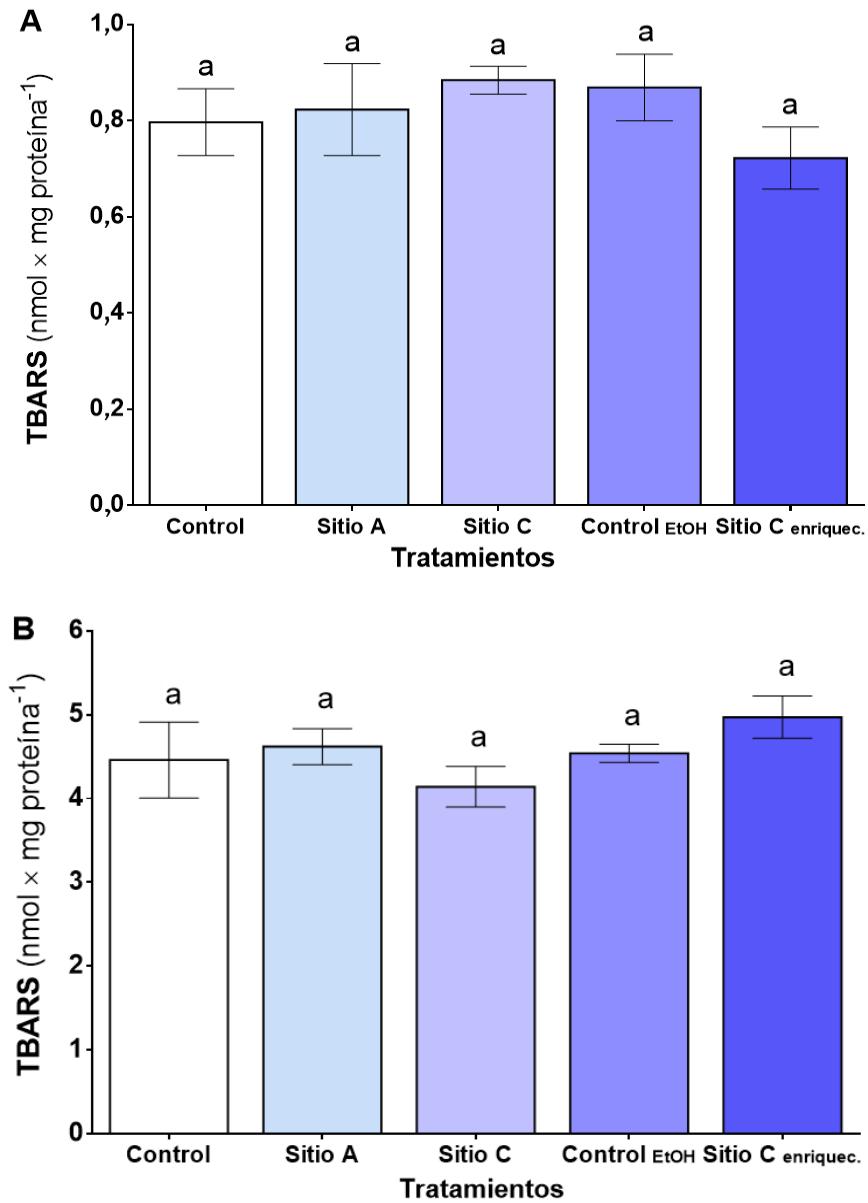


Figura 73. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS) en fracciones corporales de hembras de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas a cinco tratamientos (control y muestras ambientales de la subcuenca Las Catonas): **Control**: agua moderadamente dura (AMD); **Sitio A**: tributario aguas arriba, cercano a zona residencial, **Sitio C**: aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. **Control EtOH**: agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecida**: agua del Sitio C enriquecida con 5 μ g CPF \times L $^{-1}$ y 3 μ g PMG \times L $^{-1}$. **A**: Fracción anterior. **B**: Fracción media. Los valores se expresan como media \pm ESM (n=5-6). Barras que no presentan letras iguales indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; p<0,05.

En los niveles de TBARS no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las fracciones corporales después de la exposición a aguas de la subcuenca Las Catonas.

4.5.2.2.6. Concentraciones de clorpirifós y glifosato determinadas en las soluciones del agua de la subcuenca Las Catonas utilizadas en el bioensayo

En la Tabla 32 se detallan los valores de los parámetros fisicoquímicos de los diferentes tratamientos y las concentraciones analíticas de CPF y PMG determinadas en alícuotas de las soluciones utilizadas en el bioensayo.

Tabla 32. Parámetros fisicoquímicos de los diferentes tratamientos y concentraciones analíticas de CPF y PMG determinadas en alícuotas de los medios del bioensayo, recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final. Las concentraciones de plaguicidas fueron determinadas por cromatografía líquida de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF). Los valores se expresan como media \pm ESM.

Tratamiento	Parámetro fisicoquímico	Inicio de la exposición [PMG] mg \times L $^{-1}$	48 h (previo recambio) [PMG] mg \times L $^{-1}$	48 h (post recambio) [PMG] mg \times L $^{-1}$	96 h [PMG] mg \times L $^{-1}$
Control	pH	7,42 \pm 0,01	7,37 \pm 0,04	7,39 \pm 0,04	7,47 \pm 0,05
	Conductividad (μ S \times cm $^{-1}$)	323 \pm 1	323 \pm 1	324 \pm 1	324 \pm 1
	O $_2$ (mg O $_2$ \times L $^{-1}$)	7,98 \pm 0,01	7,96 \pm 0,03	7,98 \pm 0,01	7,97 \pm 0,02
	[CPF] (μg \times L $^{-1}$)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	[PMG] (μg \times L $^{-1}$)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Sitio A	pH	6,88 \pm 0,05	6,85 \pm 0,05	6,85 \pm 0,05	6,70 \pm 0,05
	Conductividad (μ S \times cm $^{-1}$)	423 \pm 1	424 \pm 1	424 \pm 1	425 \pm 1
	O $_2$ (mg O $_2$ \times L $^{-1}$)	7,62 \pm 0,02	7,65 \pm 0,05	7,74 \pm 0,02	7,85 \pm 0,04
	[CPF] (μg \times L $^{-1}$)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	[PMG] (μg \times L $^{-1}$)	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
		< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Sitio C	pH	7,67 \pm 0,04	7,69 \pm 0,06	7,73 \pm 0,06	7,82 \pm 0,01
	Conductividad (μ S \times cm $^{-1}$)	1218 \pm 3	1219 \pm 1	1220 \pm 1	1219 \pm 1
	O $_2$ (mg O $_2$ \times L $^{-1}$)	7,18 \pm 0,01	7,07 \pm 0,02	7,16 \pm 0,01	7,09 \pm 0,01
	[CPF] (μg \times L $^{-1}$)	4,01 \pm 0,01	3,98 \pm 0,01	3,99 \pm 0,01	3,87 \pm 0,02
		4,02 \pm 0,01	3,95 \pm 0,02	3,98 \pm 0,01	3,86 \pm 0,01
	[PMG] (μg \times L $^{-1}$)	1,45 \pm 0,01	1,42 \pm 0,01	1,42 \pm 0,02	1,39 \pm 0,01
		1,43 \pm 0,02	1,40 \pm 0,02	1,41 \pm 0,02	1,37 \pm 0,01
Control EtOH	pH	7,66 \pm 0,04	7,65 \pm 0,01	7,66 \pm 0,01	7,66 \pm 0,01
	Conductividad (μ S \times cm $^{-1}$)	1223 \pm 3	1223 \pm 1	1225 \pm 1	1224 \pm 1
	O $_2$ (mg O $_2$ \times L $^{-1}$)	7,09 \pm 0,01	7,07 \pm 0,01	7,06 \pm 0,02	7,09 \pm 0,01
	[CPF] (μg \times L $^{-1}$)	4,03 \pm 0,01	3,96 \pm 0,01	3,99 \pm 0,01	3,87 \pm 0,01
		4,01 \pm 0,02	3,89 \pm 0,01	3,90 \pm 0,01	3,85 \pm 0,02
	[PMG] (μg \times L $^{-1}$)	1,44 \pm 0,01	1,42 \pm 0,01	1,32 \pm 0,01	1,29 \pm 0,01
		1,41 \pm 0,02	1,38 \pm 0,02	1,31 \pm 0,02	1,27 \pm 0,01
Sitio C enriquecido	pH	7,68 \pm 0,01	7,69 \pm 0,01	7,68 \pm 0,01	7,69 \pm 0,02
	Conductividad (μ S \times cm $^{-1}$)	1224 \pm 2	1224 \pm 2	1225 \pm 1	1224 \pm 1
	O $_2$ (mg O $_2$ \times L $^{-1}$)	7,07 \pm 0,01	7,08 \pm 0,02	7,10 \pm 0,02	7,08 \pm 0,02
	[CPF] (μg \times L $^{-1}$)	9,08 \pm 0,02	8,88 \pm 0,01	8,95 \pm 0,01	8,89 \pm 0,01
		9,02 \pm 0,02	8,82 \pm 0,02	9,00 \pm 0,01	8,76 \pm 0,01
	[PMG] (μg \times L $^{-1}$)	4,46 \pm 0,01	4,38 \pm 0,01	4,34 \pm 0,01	4,22 \pm 0,01
		4,45 \pm 0,02	4,43 \pm 0,02	4,35 \pm 0,01	4,19 \pm 0,01

Control: agua moderadamente dura (AMD). **Sitio A:** tributario aguas arriba, cercano a zona residencial. **Sitio C:** aguas abajo de una planta de tratamiento y lindero a una zona hortícola. **Control EtOH:** agua del Sitio C con 5×10^{-4} % EtOH y **Sitio C enriquecido:** agua del Sitio C enriquecida con 5 μg CPF \times L $^{-1}$ y 3 μg PMG \times L $^{-1}$.

Los valores de pH, conductividad y oxígeno disuelto fueron estables en todos los tratamientos durante los diferentes tiempos del bioensayo y se encontraron dentro del rango de los valores obtenidos *in situ* durante el muestreo. Se verificó que los valores de los parámetros fisicoquímicos determinados en el control con AMD coinciden con los establecidos por US EPA, 1993 para la preparación de esta agua. Para el caso de los plaguicidas, no se identificó la presencia de CPF ni PMG en el control con AMD ni en las muestras del Sitio A. Por otra parte, en el Sitio C las concentraciones promedio de CPF fueron de 4,02 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y de PMG 1,44 $\mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$ al iniciar el bioensayo.

4.6. Discusión

Los cuerpos de agua como el río Reconquista son receptores de diferentes tipos de contaminantes generados por la actividad residencial, agrícola e industrial y por las plantas de tratamiento de aguas urbanas, entre otras. Estos desechos son una mezcla de compuestos que pueden ocasionar efectos nocivos sobre los organismos que allí residen. El río Reconquista es el segundo río más contaminado de Argentina (Salibián 2006), diferentes autores han estudiado la calidad toxicológica de sus aguas utilizando a los peces como organismos *test* (de la Torre *et al.*, 2005, 2007; Ossana *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos para la calidad del agua de los sitios estudiados en este Capítulo muestran que los valores de concentración de nitritos y amonio determinados para el Sitio C superan los establecidos por la Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina para la protección de la vida acuática, Decreto 831/93 (LRPA,1993). Por otra parte, con respecto a los niveles de metales, el 36% de los analizados en el Sitio A y en 73% en el Sitio C se encuentran por encima de los niveles guía propuestos por esta misma Ley. El índice de la calidad de agua evidenció que el Sitio A se encuentra entre el límite de contaminación intermedia y contaminación elevada, y el Sitio C corresponde a contaminación elevada.

En este Capítulo se evaluó la respuesta de diferentes biomarcadores de neurotoxicidad, de estrés oxidativo, y alteraciones en los niveles de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas en ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a muestras ambientales de agua de la subcuenca Las Catonas y a muestras de uno de los sitios con el agregado de las concentraciones más altas de CPF (5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$) y de PMG (3 $\mu\text{g PMG} \times \text{L}^{-1}$) identificadas durante los dos años de muestreo.

La actividad de AChE evidenció una disminución estadísticamente significativa del 32% en los organismos expuestos a una muestra ambiental del Sitio C y del 49% para la exposición a agua del Sitio C enriquecida. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en el laboratorio después de la exposición a 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Bernal-Rey *et al.*, 2020; ver también Capítulo 2 de esta Tesis), aunque en los bioensayos de exposición a medios preparados de CPF la inhibición observada para esta concentración resultaba mayor. La acción de esta enzima, como se mencionó, es fundamental en actividades

fisiológicas y locomotoras de los peces, como la búsqueda de alimento, evasión de depredadores, entre otros (Moreira y Guilhermino, 2005; Bradbury *et al.*, 2008). Por lo tanto, su inhibición después de la exposición al agua de la subcuenca Las Catonas, podría influir en el desarrollo de las actividades anteriormente mencionadas. Los efectos observados podrían deberse no sólo a la presencia de CPF, sino también a otros plaguicidas o contaminantes. Diversos son los compuestos que pueden estar presentes en la muestra de agua con acción neurotóxica. Los autores de la Torre *et al.* (2002) reportaron para *C. decemmaculatus* la disminución de la actividad de esta enzima (entre el 19 y el 31%) en el cerebro de peces capturados en cuerpos de agua provenientes de la parte media del río Reconquista, donde los distintos insecticidas evaluados (incluyendo CPF) resultaron no detectables, pero sí se determinaron concentraciones de metales pesados (Cd, Cu, Pb, Zn) mayores a los límites de protección de la vida acuática. En estos trabajos se resalta la sensibilidad de esta enzima y es propuesta como un biomarcador para ensayos ecotoxicológicos en *C. decemmaculatus*.

La actividad de CAT y GST son biomarcadores indicativos de la actividad antioxidante celular. El aumento de la actividad de CAT en la fracción anterior de los organismos expuestos a muestras de agua del Sitio C es similar a los resultados obtenidos en esta Tesis después de la exposición a $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Al mismo tiempo, se observa un mayor efecto para el tratamiento con la muestra del Sitio C enriquecida con CPF y PMG, lo que reafirma el rol de CPF para producir los cambios sobre esta enzima antioxidante. Sin embargo, el aumento de la actividad de esta enzima también podría deberse a la presencia de metales en el cuerpo de agua. El sistema redox es activado por metales como el Fe, Cu y Cr, y es sensible a los efectos de distintos estresores ambientales (Hermes-Lima, 2004). Los niveles del Cu en el Sitio C fueron superiores a los establecidos para la protección de la vida acuática. Contrariamente a nuestros resultados, Ossana *et al.* (2016) no observaron la modificación de la actividad CAT en la fracción anterior ni en la fracción media del cuerpo de ejemplares de *C. decemmaculatus* luego de 96 h de exposición a muestras de agua del río Reconquista. Por otra parte, Baudou *et al.* (2019) informaron un aumento de CAT del 67% en el hígado de la misma especie luego de 12 días de exposición a muestras de agua de este río.

La actividad de GST en la fracción anterior presentó un aumento estadísticamente significativo del 64% para la exposición al Sitio C, 67% para el Control EtOH y del 66%

para la muestra del Sitio C enriquecida. Estos efectos no podrían ser atribuidos en forma individual al CPF o al PMG, ya que en los bioensayos de exposición a medios preparados de estos plaguicidas no se observaron cambios en la actividad de GST en la fracción anterior. En la fracción media y posterior no se obtuvieron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos con muestras ambientales. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Baudou *et al.* (2019) quienes no observaron modificación de esta enzima en el hígado de *C. decemmaculatus* luego de 12 días de exposición a muestras de agua del río Reconquista. A diferencia de estos resultados Ossana *et al.* (2016), observaron una inhibición del 40% en la fracción media del cuerpo de esta misma especie, después de 96 h de exposición a muestras de aguas de este río.

El contenido de GSH hepático es indicador de procesos de biotransformación de tóxicos. GSH es un cofactor de varias enzimas entre ellas la GST, y se encuentra principalmente en el hígado. Después de la exposición a muestras de agua de la subcuenca Las Catonas no se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de GSH. Estos resultados concuerdan con lo descripto previamente por Baudou *et al.* (2019) quienes no observaron cambios en GSH después de 12 días de exposición a aguas del río Reconquista. Sin embargo, Ossana *et al.* (2016), observaron un aumento en el contenido de GSH del 65% en *C. decemmaculatus* después de 96 h de exposición al agua de este río. La exposición al agua del Sitio C enriquecida con CPF y PMG generó un incremento del 59% en la fracción media, mientras que en la fracción anterior y posterior no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos. Los cambios observados en GSH para la exposición a la muestra enriquecida no fueron observados para la exposición a las concentraciones individuales de CPF, mientras que para los bioensayos con PMG las concentraciones ensayadas no son comparables con las de este Capítulo. Estos resultados sugerirían que el efecto observado podría deberse a los plaguicidas, pero en interacción con otros compuestos presentes en esta matriz compleja.

La actividad de SOD en la fracción corporal media disminuyó el 54% después de la exposición al agua del Sitio A; el 58% a la del Sitio C; el 62% con el Control EtOH y el 52% con la del Sitio C enriquecida con CPF y PMG. Los efectos observados podrían deberse a otros contaminantes presentes en ambos sitios de muestreo, diferentes a los plaguicidas, como por ejemplo los metales que se encontraron por encima de los límites para la protección de la vida acuática. En la fracción anterior y posterior no se obtuvieron

diferencias significativas en ninguno de los diferentes tratamientos. Los resultados de esta Tesis fueron muy similares a los reportados por Scarcia *et al.* (2014), quienes estudiaron el impacto *in situ* en *Cyprinus carpio* y *Pimelodella laticeps* de la exposición durante 14 días a dos sitios contaminados en el río Luján (aguas arriba y aguas debajo de una planta de tratamiento). Los autores informaron un aumento significativo de actividad de SOD y GST, y no observaron cambios en la actividad de CAT en el hígado de estas especies. A diferencia de los resultados obtenidos en esta Tesis, observaron un aumento en TBARS que podría deberse al mayor tiempo de exposición utilizado.

La exposición a un cuerpo de agua puede generar diversas respuestas dependiendo de la especie, la fracción corporal y el tóxico analizado. Una muestra de agua de un río es una matriz compleja y la adición de un contaminante no necesariamente conduce a un mayor efecto en los organismos. En la presente investigación se observó, en la actividad de CAT y en los niveles de GSH, una diferencia en los efectos de los tratamientos con agua del Sitio C y del Sitio C enriquecida con CPF y PMG, poniendo en evidencia el efecto de los plaguicidas sobre estos biomarcadores. En el caso de la actividad de CAT, el efecto determinado en el tercio anterior para la muestra enriquecida es mayor al correspondiente al observado para la exposición al Sitio C, y además resulta coincidente con lo observado en el Capítulo 3 para la exposición individual a CPF, pudiendo ser este plaguicida el causante de los cambios observados. Por otra parte, los ensayos de exposición individual a los plaguicidas no mostraron los cambios en los niveles de GSH determinados en el presente Capítulo, lo que estaría evidenciando que el efecto observado para la muestra Sitio C enriquecida podría no deberse a los plaguicidas individualmente, sino a la interacción entre los mismos y los diferentes compuestos presentes en la muestra ambiental en la que también pueden existir efectos sinérgicos o antagónicos. Algunos cambios en los biomarcadores fueron ya observados para la exposición al Sitio C, sin agregado de plaguicidas, pudiendo deberse a los plaguicidas presentes en la muestra natural como también a otros contaminantes, o la interacción entre ellos. Este es el caso de la actividad de AChE, cuya disminución podría deberse a los niveles de CPF. En cuanto al aumento en la actividad de GST, no puede sugerirse ni descartarse una relación con la exposición a los plaguicidas, mientras que para SOD es probable que el efecto se deba a otros contaminantes.

La compleja composición de las mezclas de contaminantes en muestras ambientales al ser de variada naturaleza y diferentes orígenes, no solo pueden inducir estrés oxidativo generando diferentes respuestas en cada órgano, y efectos de neurotoxicidad, sino también afectar a otros niveles (genéticos, comportamentales, estado nutricional, entre otros). El aumento de CAT, GSH y GST y la inhibición de la actividad de la enzima AChE y SOD, después de la exposición a muestras de agua de la subcuenca de Las Catonas, pone en evidencia la importancia de realizar bioensayos de exposición para la caracterización ecotoxicológica, ya que, la determinación de los parámetros fisicoquímicos, plaguicidas y de metales por sí solo puede resultar insuficiente.

4.7. Conclusiones

- Las muestras de agua de la subcuenca Las catonas del Sitio A se caracterizaron entre el límite de contaminación intermedia y contaminación elevada y las del Sitio C como contaminación elevada, según el índice de calidad del agua utilizado. Asimismo, la concentración de algunos de los metales disueltos determinados en los sitios de estudio superó los niveles guía establecidos para la protección de la vida acuática. En el Sitio A los niveles de CPF y PMG resultaron no detectables, mientras que en el Sitio C se identificó la presencia de esos plaguicidas. Esto podría representar una situación de riesgo y tener efectos sobre la biota presente.

Después de la exposición *in vivo* por 96 h a muestras de agua de la subcuenca Las Catonas, bajo las condiciones experimentales utilizadas, podemos concluir:

La actividad de AChE en la fracción anterior de *Cnesterodon decemmaculatus* resultó un biomarcador de neurotoxicidad sensible a la exposición de muestras de agua de la subcuenca Las Catonas, pudiendo esto deberse a los efectos de los niveles de CPF presentes en las mismas.

Los parámetros de defensas antioxidantes, particularmente la actividad de CAT y GST en la fracción anterior, y la actividad de SOD en la fracción media, resultaron ser biomarcadores sensibles en bioensayos de exposición aguda realizados con muestras ambientales de agua de la subcuenca Las Catonas. Mientras que, GSH en la fracción media mostró cambios para la exposición a la muestra enriquecida. La comparación entre

los resultados obtenidos, sugieren que los plaguicidas serían, al menos en parte, causantes de los efectos sobre la actividad de CAT y los niveles de GSH.

La exposición de muestras ambientales de la subcuenca en las condiciones ensayadas no produjo daño de peroxidación lipídica.

Este cuerpo de agua presenta un deterioro en la calidad del agua que causa efectos adversos sobre parámetros biomarcadores en los peces, los cuales pueden ser determinados en laboratorio mediante bioensayos de exposición con hembras de *Cnesterodon decemmaculatus*.

Los cambios observados en los biomarcadores analizados ponen en evidencia la importancia de complementar los monitoreos fisicoquímicos con el estudio de respuestas biológicas, y viceversa, que permitan evidenciar efectos tempranos de los contaminantes sobre organismos que allí habitan, considerando la complejidad de las matrices reales. A la vez, resulta relevante que este tipo de evaluaciones ecotoxicológicas sean incorporadas en las legislaciones de los sistemas acuáticos.

Conclusiones generales

A partir de los objetivos planteados y los resultados obtenidos en esta Tesis se pueden obtener las siguientes conclusiones más relevantes:

La composición hidroquímica de los sitios de estudio en un arroyo de la subcuenca Las Catonas, corresponde a bicarbonatada sódica, está relacionada con los procesos de meteorización de rocas, y concuerda con las características del agua de las lagunas pampásicas. Así mismo, el análisis de los parámetros fisicoquímicos permitió evidenciar dos factores de variación: un factor temporal relacionado con la variación estacional como el caudal, la temperatura, las precipitaciones; y un factor espacial asociado posiblemente a las actividades antropogénicas.

Se identificó en los sitios de estudio concentraciones de metales disueltos que superaron en mucho de los casos los niveles guía establecidos para la protección de la vida acuática. Además de la presencia de 4 plaguicidas: DEET, paraquat, clorpirifós y glifosato. Esto posiblemente se deba a actividades industriales y agrícolas desarrolladas aguas arriba de los sitios de muestreo y en la planta de tratamiento.

Los estudios realizados en esta Tesis han demostrado que la actividad de AChE resultó ser un biomarcador de neurotoxicidad sensible a la exposición *in vivo* a glifosato y clorpirifós en *C. decemmaculatus*, incluso a concentraciones que son ambientalmente relevantes. A la vez, pudo determinarse que existe una potencial reversibilidad de los efectos de estos plaguicidas sobre la actividad de esta enzima.

La inhibición de la AChE *in vivo* por la exposición a CPF difiere entre *G. affinis* y *C. decemmaculatus*, siendo esta última la especie más susceptible. La exposición *in vitro* a CPF-oxón mostró una mayor sensibilidad de la enzima de *C. decemmaculatus* que la de *G. affinis*. Por lo tanto, la diferencia observada entre estas especies puede deberse a una diferencia de la sensibilidad de la enzima al metabolito activo CPF-oxón.

La exposición *in vitro* a PMG y su metabolito AMPA, permitió descartar la existencia de un mecanismo directo de inhibición de la actividad de la enzima AChE por estos compuestos. Para identificar las posibles causas de la disminución de la actividad de esta enzima en

C. decemmaculatus luego de la exposición *in vivo* se debe estudiar el metabolismo del contaminante asociado a los mecanismos indirectos.

La exposición *in vivo* de *C. decemmaculatus* a CPF y PMG, produjo una variabilidad en la respuesta de los distintos biomarcadores de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas y alteraciones en la enzima detoxificante; no observándose efectos de daño oxidativo. Los resultados obtenidos difieren entre cada plaguicida (CAT para CPF, y GSH y GST para PMG), y entre las distintas fracciones corporales. Estas diferencias observadas pueden deberse a una disimilitud en las vías de metabolización y del destino de estos contaminantes.

Se determinaron efectos sobre distintos biomarcadores luego de la exposición a muestras de agua de la subcuenca Las Catonas (cuenca del Río Reconquista). Estos resultados demuestran el deterioro del agua de los sitios de estudio y son coherentes con los valores obtenidos al calcular el índice de calidad del agua (ICAB), donde el Sitio A se encuentra entre el límite de contaminación intermedia y contaminación elevada y el Sitio C como contaminación elevada. Es relevante resaltar que todas estas respuestas se observaron después de 96 h de exposición poniendo en evidencia la sensibilidad de estos biomarcadores.

Las muestras de agua de los sitios de estudio no produjeron mortalidad significativa de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus*. Sin embargo, la exposición a las mismas causa efectos adversos sobre parámetros biomarcadores en los peces, los cuales pueden ser determinados en laboratorio mediante bioensayos de exposición con hembras de esta especie y resultan apropiados para evaluar el impacto temprano de los contaminantes.

La actividad de AChE y los parámetros de defensas antioxidantes, como la actividad de CAT, GST, SOD y GSH en diferentes fracciones corporales de *Cnesterodon decemmaculatus*, resultaron ser biomarcadores sensibles después de la exposición aguda a muestras de agua de la subcuenca Las Catonas. La comparación de los resultados obtenidos por la exposición a muestras sintéticas, ambientales y enriquecidas con CPF y PMG, sugieren que los plaguicidas serían, al menos en parte, causantes de los efectos sobre la actividad de AChE, CAT y los niveles de GSH.

Los resultados de esta Tesis son una contribución ya que son pocas las investigaciones relacionadas con estos plaguicidas (PMG y CPF) donde se utilizan concentraciones bajas, de relevancia ambiental, como las ensayadas.

El teleósteo nativo *Cnesterodon decemmaculatus* demostró ser un muy buen modelo experimental para ser utilizado y validado como especie test en ensayos ecotoxicológicos.

Los resultados obtenidos permiten evidenciar la importancia de complementar los monitoreos fisicoquímicos de los cuerpos de agua con estudios ecotoxicológicos, y viceversa, para así evidenciar a partir de respuestas biológicas el efecto de los contaminantes sobre los organismos que allí habitan, como la especie nativa *Cnesterodon decemmaculatus*. Además, resulta relevante destacar la importancia de involucrar estos estudios toxicológicos en las legislaciones de los sistemas acuáticos.

Anexos

Anexo 1. Composición del agua superficial de diferentes cuerpos de agua.

Tabla A1. Composición fisicoquímica del agua superficial de ríos de distintas partes del mundo.

Parámetro	Río Lujan, Argentina (Lombardo <i>et al.</i> , 2010)	Río Mekong China (Shrestha <i>et al.</i> , 2008)	Río Thur Suiza Hayashi <i>et al.</i> , 2012)
T (°C)	18,3	*	13,0
OD (mg O ₂ × L ⁻¹)	5,44	8,07	19,5
pH	8,00	7,88	8,51
Cond. (μS/cm)	363,3	23,98	*
Alcalinidad (mg CaCO ₃ × L ⁻¹)	440	1,83	220
DQO (mg O ₂ × L ⁻¹)	*	1,79	*
Dureza (mg CaCO ₃ × L ⁻¹)	41,03	*	*
Nitrato (mg NO ₃ ⁻ × L ⁻¹)	4,37	1,08	9,80
Amonio (mg NH ₄ ⁺ × L ⁻¹)	0,049	0,064	
Fósforo inorgánico (mg PO ₄ ³⁻ × L ⁻¹)	0,38	0,02	<0,002
Calcio (mg Ca ²⁺ × L ⁻¹)	9,61	1,41	70,65
Magnesio (mg Mg ²⁺ × L ⁻¹)	4,37	0,53	14,44
Sodio (mg Na ⁺ × L ⁻¹)	114	0,41	14,57
Potasio (mg K ⁺ × L ⁻¹)	5,47	0,05	2,93
Cloruro (mg Cl ⁻ × L ⁻¹)	28,00	0,25	21,66
Sulfato (mg SO ₄ ²⁻ × L ⁻¹)	37,46	29,78	11,43

(*) No se informa valor

Anexo 2. Valores guía para la protección de la vida acuática

Se describen valores guía para la protección de la vida acuática propuesto por diferentes entidades reguladoras. En la Tabla A2, se muestran valores para algunos parámetros fisicoquímicos y en la Tabla A3 para diferentes metales.

Tabla A2a. Valores guía para algunos parámetros fisicoquímicos establecidos por diferentes entidades reguladoras para la protección de la vida acuática

Parámetros	AIC y SGA, 1996	SRHN, 2005	INA, 2011	Ley 24051. Decreto 831
T (°C)	*	*	< 3°C por encima del valor del fondo	*
OD (mg O ₂ × L ⁻¹)	> 4	> 5	> 5	*
pH	6,5 – 8,5	6,5 – 8,5	pH: 6 ≤ pH ≤ 9	*
Cl ⁻ (mg Cl ⁻ × L ⁻¹)	250	*	*	*
Cond. (μS/cm)	*	*	*	*
Turbidez (NTU)	*	*	*	*
Alcalinidad (mg CaCO ₃ × L ⁻¹)	*	*	*	*
DQO (mg O ₂ × L ⁻¹)	*	*	*	*
DBO ₅ (mg O ₂ × L ⁻¹)	*	3	< 3	*
Dureza (mg CaCO ₃ × L ⁻¹)	*	*	*	*
Nitrito (mg NO ₂ ⁻ × L ⁻¹)	0,06	≤ 0,06	-	0,06
Nitrato (mg NO ₃ ⁻ × L ⁻¹)	*	*	*	*
Amonio (mg NH ₄ ⁺ × L ⁻¹)	0,13 - 3,21 según pH	0,5	< 0,8	1,37
Fósforo inorgánico (mg PO ₄ ³⁻ × L ⁻¹)	*	0,05	< 0,01	*

AIC y SGA: Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro y Secretaría de Gestión Ambiental (1996); SRHN: Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005); INA: Instituto Nacional del Agua (2011); Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina, Decreto 831/93 (LRPA,1993). (*) No se adopta valor de referencia.

Tabla A2b. Valores guía para la protección de la vida acuática para diferentes metales establecidos por algunas entidades reguladoras.

Concentraciones ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	AIC y SGA, 1996	SRHN, 2005	INA, 2011	Ley 24051. Decreto 831
Litio (Li)	1000	*	*	*
Aluminio (Al)	5 -100 de acuerdo con los valores de pH y DQO	*	*	*
Vanadio (V)	100	100	*	100
Cromo (Cr)	2	2	2	2
Manganoso (Mn)	100	*	*	100
Hierro total (Fe)	300	*	*	*
Cobalto (Co)	1000	*	*	*
Níquel (Ni)	25 -150 de acuerdo con los valores de dureza	*	*	25
Cobre (Cu)	2 – 4 de acuerdo con los valores de dureza	2	*	2
Zinc (Zn)	30	30	*	30
Arsénico (As)	50	50	150	50
Selenio (Se)	1	1	*	1
Cadmio (Cd)	0,2 – 1,8 de acuerdo con los valores de dureza	0,2	0,25	0,2
Plomo (Pb)	1 – 7 de acuerdo con los valores de dureza	1	2	1

AIC y SGA: Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro y Secretaría de Gestión Ambiental (1996); SRHN: Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005); INA: Instituto Nacional del Agua (2011); Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina, Decreto 831/93 (LRPA,1993). (*) No se adopta valor de referencia.

Anexo 3. Metodologías analíticas

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos de nitrato, nitrito, amonio y fosfato se utilizaron técnicas analíticas colorimétricas (HACH, 2010).

Las concentraciones de nitrato se midieron utilizando el método por el cual el nitrato presente en la muestra se reduce a nitrito en presencia de cadmio. El ion nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio que se une al ácido gentísico para formar un producto de color ámbar. Esta coloración presenta una absorbancia máxima a 500 nm (HACH, 2000).

El nitrito se determinó a través del método de diazotización. El nitrito presente en la muestra reacciona con el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia que se acopla al ácido cromotrópico para producir un complejo de color rosa, determinado a 507 nm (HACH, 2000).

El amonio se determinó a partir del método del salicilato, el amonio libre reacciona con el hipoclorito para formar monocloramina. Ésta reacciona con el salicilato, en presencia de sodio nitroferricianuro, para formar 5-aminosalicilato, un complejo de color verde, que presenta una absorbancia máxima a 655 nm (HACH, 2003).

El fósforo inorgánico reacciona con el molibdato en un medio ácido para producir un complejo de fósfololibdato. Luego, el ácido ascórbico reduce dicho compuesto produciendo un complejo de fosfomolibdeno de color azul intenso que es medido a 890 nm (HACH, 2002).

A partir de estos parámetros se calculó el N inorgánico total y P inorgánico total, como estimadores del estado trófico del cuerpo de agua.

Para la determinación de dureza y alcalinidad se usaron técnicas titulométricas.

La dureza se midió utilizando un titulador digital con EDTA. La muestra se hace alcalina con hidróxido de potasio (pH 12-13) para precipitar el magnesio presente como hidróxido de magnesio. Posteriormente se agregó un indicador calmagita (Manver2) que se combina

con calcio para formar un complejo de color entre rosa y rojo. Cuando se agrega EDTA, éste reacciona con los iones de calcio libres provocando la liberación de iones calcio a partir del complejo calmagita-Ca. Cuando no quedan más iones libres de calcio, la solución se vuelve azul debido a la presencia de la calmagita libre (HACH, 2002).

La alcalinidad fue determinada volumétricamente por titulación con H_2SO_4 y fue expresada como CaCO_3 . Para muestras cuyo pH inicial es superior a 8,3 la titulación con H_2SO_4 se hace en dos pasos. El primer paso consiste en bajar el pH a 8,3 utilizando como indicador la fenolftaleína que vira de rosado a incoloro. En el segundo paso, se hace la titulación con ácido sulfúrico hasta alcanzar un pH de 4,5 utilizando como indicador el verde bromocresol el cual vira de un color gris azulado verdoso claro a un color rosa claro. Cuando el pH de las muestras es menor a 8,3 se hace directamente la titulación del segundo paso. La alcalinidad total a pH 4,5 incluye al carbonato, bicarbonato e hidróxido.

La DQO se determinó según el estándar método 5220 D. Las muestras fueron digeridas utilizando dicromato de potasio como agente oxidante en medio ácido. Para muestras con concentración entre 100 a 900 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ el Cr^{3+} la disminución del dicromato se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 600 nm y para concentraciones menores a 90 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ se lo determinó el Cr^{6+} a 420 nm.

La concentración de iones conservativos mayoritarios se determinó por cromatografía iónica (Zhu *et al.* 1999). Se utilizó un equipo Dionex DRX – 100, con una columna AG22-AS22, detector de conductividad, y un loop de inyección de 25 μL . La corrida cromatográfica para los aniones se realizó con un eluyente mezcla de Na_2CO_3 4,5 mM y NaHCO_3 1,4 mM, y un flujo de 1 $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$.

Previamente a la cuantificación de aniones se inyectaron soluciones multipatrón de las siguientes concentraciones: 5; 10; 25; 50; 75 y 100 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Cl^- y de SO_4^{2-} obtenidas a partir de soluciones madre de 1000 $\text{mg} \text{Cl}^- \times \text{L}^{-1}$ preparada con NaCl (s) y 1000 $\text{mg} \text{SO}_4^{2-} \times \text{L}^{-1}$ preparada con Na_2SO_4 (s) de grado analítico (Merck® 99%). Luego se inyectaron las alícuotas de las muestras.

La corrida cromatográfica para los cationes se realizó con un eluyente mezcla de HCl 40 mM y DL-2,3- ácido aminopropanoico 4 mM, y un flujo de 2 $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$. Se preparó una

solución madre de $1000 \text{ mg Na}^+ \times \text{L}^{-1}$, $1000 \text{ mg K}^+ \times \text{L}^{-1}$, $1000 \text{ Mg}^{2+} \times \text{L}^{-1}$ y $1000 \text{ mg Ca}^{2+} \times \text{L}^{-1}$ preparadas con las sales NaCl, KCl; MgCl₂, CaCO₃ respectivamente. De cada una de esas soluciones se prepararon patrones multicomponentes las concentraciones se presentan en la Tabla A. Posteriormente se inyectaron las alícuotas de las muestras.

Tabla A3. Concentraciones preparadas en los patrones multicomponentes

Concentración	mg Na ⁺ × L ⁻¹	mg Mg ²⁺ × L ⁻¹	mg K ⁺ × L ⁻¹	mg Ca ²⁺ × L ⁻¹
1	5	2,5	0,5	5
2	10	5	1,5	10
3	20	12,5	5	20
4	25	20	10	35

Por último, tanto para aniones como para cationes, las muestras se cuantificaron contra la curva de calibración realizada a partir de las soluciones de multipatrón. En ambos casos se utilizó el software Clarity Lite.

Anexo 4. Valores de parámetros fisicoquímicos determinados en muestras de agua

Tabla A4. Parámetros fisicoquímicos determinados en muestras de agua durante dos años en tres sitios de la subcuenca Las Catonas (cuenca del Río Reconquista, Cuartel V, Partido Moreno, Provincia de Buenos Aires).

Parámetro	Invierno 2017			Primavera 2017			Verano 2018			Otoño 2018			Invierno 2018			Primavera 2018			Verano 2019			Otoño 2019		
	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC
Temperatura (°C)	10,8	12,8	10,8	30,0	30,8	28,1	22,6	18,8	17,4	10,2	9,8	8,8	15,4	15,3	14,5	24,3	22,9	19,8	22,4	18,3	18,9	14,4	15,8	15,6
Media	0,2	0,3	0,2	0,6	1,2	1,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,7	0,7	0,6	0,6	0,4	0,1	0,3	0,2	0,4
Error																								
Conductividad (µS x cm ⁻¹)	405	885	847	591	725	704	555	1062	1012	368	697	684	635	890	840	555	925	965	345	995	990	695	1020	1045
Media	5	4	1	1	3	3	4	4	1	5	1	2	5	1	10	5	5	5	15	5	10	5	10	5
Error																								
Oxígeno Disuelto (mg O ₂ x L ⁻¹)	7,42	7,64	7,36	3,97	3,46	3,55	10,40	6,63	5,82	8,90	9,19	6,85	12,04	11,35	7,31	4,83	7,69	7,31	3,26	5,86	5,45	6,54	6,10	5,27
Media	0,25	0,20	0,05	0,22	0,01	0,31	0,20	0,07	0,16	0,05	0,04	0,04	0,14	0,20	0,02	0,08	0,30	0,34	0,22	0,13	0,04	0,23	0,08	0,09
Error																								
pH	7,10	7,60	7,70	7,80	7,85	7,95	8,88	7,98	7,66	7,04	7,12	6,51	8,35	7,85	7,70	7,25	7,60	7,50	7,10	7,65	7,55	7,60	7,65	7,65
Media	0,10	0,10	0,01	0,01	0,05	0,05	0,23	0,01	0,01	0,04	0,02	0,01	0,05	0,15	0,10	0,05	0,10	0,10	0,20	0,15	0,25	0,30	0,15	0,05
Error																								
Alcalinidad (mg CaCO ₃ x L ⁻¹)	321	345	344	208	383	385	261	452	456	247	399	408	321	416	412	169	317	311	151	355	355	216	336	323
Media	1	1	1	2	1	2	1	1	4	2	2	1	6	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2
Error																								
Dureza (mg CaCO ₃ x L ⁻¹)	80	116	129	100	152	161	77	122	131	79	141	138	89	134	135	76	131	127	83	129	127	24	157	129
Media	2	4	9	2	4	4	1	1	1	1	6	4	2	1	1	1	1	3	3	1	1	1	2	1
Error																								
Nitrito (mg NO ₂ x L ⁻¹)	0,048	1,043	0,961	0,021	1,643	1,741	0,008	1,117	1,133	0,056	0,589	0,530	0,100	0,227	0,255	0,171	0,550	0,570	0,343	1,149	1,223	0,034	1,683	1,511
Media	0,015	0,025	0,008	0,002	0,033	0,099	0,002	0,033	0,016	0,003	0,002	0,005	0,002	0,003	0,005	0,002	0,002	0,005	0,033	0,008	0,002	0,008	0,033	
Error																								
Nitrato (mg NO ₃ ⁻ x L ⁻¹)	2,9	12,2	11,5	4,7	16,4	12,8	<0,4*	8,0	8,0	6,6	13,7	14,2	5,5	6,9	9,3	4,0	11,5	11,3	4,2	9,3	9,3	3,5	15,7	14,4
Media	0,2	0,2	0,4	0,7	0,9	0,4		0,4	0,2	0,4	0,9	0,9	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2
Error																								
Amonio (mg O ₂ x L ⁻¹)	0,174	6,052	5,408	0,142	0,367	1,095	<0,013*	6,953	7,983	0,039	5,408	6,181	0,142	3,992	3,766	0,116	1,481	1,738	0,406	2,833	2,768	0,071	7,340	5,408
Media	0,01	0,90	0,26	0,01	0,01	0,06		0,26	0,26	0,01	0,26	0,26	0,03	0,17	0,10	0,01	0,06	0,06	0,01	0,13	0,06	0,01	0,13	0,26
Error																								
DQO (mg O ₂ x L ⁻¹)	28	27	17	36	22	112	72	7	9	14	8	9	64	35	6	78	34	13	92	47	13	68	28	11
Media	5	4	1	1	3	3	4	4	1	5	1	2	5	1	10	5	5	5	15	5	10	5	10	5
Error																								

*Límite de cuantificación

Continuación Tabla A4. Parámetros fisicoquímicos determinados en muestras de agua durante dos años en tres sitios de la subcuenca Las Catonas (cuenca del Río Reconquista, Cuartel V, Partido Moreno, Provincia de Buenos Aires).

Parámetro	Invierno 2017			Primavera 2017			Verano 2018			Otoño 2018			Invierno 2018			Primavera 2018			Verano 2019			Otoño 2019		
	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC
Fósforo inorgánico (mg PO ₄ ³⁻ × L ⁻¹)	0,65	1,07	1,13	2,02	5,05	3,75	1,04	6,60	6,60	1,98	2,44	2,61	2,42	1,49	1,48	2,74	5,50	4,50	3,45	4,03	3,93	1,75	8,15	5,65
Media																								
Error	0,01	0,01	0,01	0,05	0,15	0,15	0,01	0,05	0,05	0,02	0,06	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,10	0,10	0,05	0,02	0,03	0,01	0,05	0,05
Turbidez NTU	70,8	13,2	12,2	43,5	91,8	40,0	131,7	69,6	54,6	25,1	9,7	18,4	22,4	4,5	9,9	32,5	13,2	11,3	90,9	5,0	6,0	41,0	4,5	8,5
Media																								
Error	0,6	0,1	0,2	2,0	1,2	0,4	1,5	0,4	1,6	0,1	0,1	0,9	0,5	0,1	0,1	3,3	0,5	0,9	1,3	0,1	0,1	1,0	0,5	0,5
Cloruros (mg Cl ⁻ × L ⁻¹)	12,0	104,2	106,2	19,8	64,3	68,3	22,8	99,6	100,9	15,8	60,5	62,0	20,6	41,9	41,6	21,2	42,4	43,1	11,2	48,3	48,2	21,9	40,1	40,8
Media																								
Error	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,9	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
Sulfatos (mg SO ₄ ²⁻ × L ⁻¹)	11,6	38,1	54,0	12,5	29,6	29,0	9,5	43,9	44,2	11,1	35,3	35,7	10,6	26,4	25,9	5,9	17,2	17,1	8,3	16,5	16,6	11,2	17,3	17,2
Media																								
Error	0,1	0,2	0,8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Potasio (mg K ⁺ × L ⁻¹)	9,49	12,58	12,36	6,50	8,17	7,92	4,58	12,09	11,19	3,15	7,55	7,20	2,46	5,74	5,73	2,64	7,16	6,07	2,55	6,60	6,77	2,11	9,74	6,68
Media																								
Error	0,09	0,05	0,07	0,12	0,06	0,09	0,04	0,07	0,07	0,06	0,08	0,01	0,06	0,09	0,01	0,08	0,15	0,05	0,07	0,12	0,06	0,02	0,08	0,09
Sodio (mg Na ⁺ × L ⁻¹)	84,2	179,2	196,1	148,5	177,6	181,7	90,7	233,2	215,0	89,5	176,9	164,3	89,9	108,5	204,5	71,1	136,4	155,8	56,6	150,1	152,3	139,5	197,2	151,0
Media																								
Error	1,6	2,6	3,2	0,7	1,0	1,0	1,7	3,8	1,6	0,5	0,1	4,7	1,4	1,2	2,1	4,2	1,3	3,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,5	0,9
Calcio (mg Ca ²⁺ × L ⁻¹)	29,2	36,9	20,2	15,8	23,7	24,6	10,5	31,2	16,6	18,5	26,5	23,9	16,2	29,0	19,1	15,4	20,1	27,7	12,5	24,8	26,0	13,7	28,4	25,6
Media																								
Error	1,1	2,1	1,3	0,8	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,7	1,5	0,9	0,1	0,3	0,1	0,7	0,2	0,1	0,4	0,5	1,0	0,1	0,1	0,5
Magnesio (mg Mg ²⁺ × L ⁻¹)	8,2	14,3	14,7	11,3	12,6	17,3	4,2	17,3	16,5	7,0	16,1	11,8	6,8	17,8	14,9	6,1	13,3	16,6	5,8	14,8	14,8	7,4	19,4	15,8
Media																								
Error	0,2	0,3	0,2	0,5	0,1	0,6	0,1	0,1	0,2	0,5	0,7	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3

Anexo 5. Valores de algunos metales determinados en muestras de agua

Tabla A5. Valores de algunos metales determinados en muestras de agua durante dos años en tres sitios de la subcuenca Las Catonas (cuenca del Río Reconquista, Cuartel V, Partido Moreno, Provincia de Buenos Aires).

Metal ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	Invierno 2017			Primavera 2017			Verano 2018			Otoño 2018			Invierno 2018			Primavera 2018			Verano 2019			Otoño 2019		
	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC	SA	SB	SC
Aluminio (Al)	189	65	10	535	172	200	726	215	322	282	59	79	153	12	16	128	293	368	882	81	86	69	< LC	< LC
Hierro (Fe)	155	69	33	338	106	165	466	177	222	287	89	112	95	28	30	104	58	91	610	92	100	63	30	36
Estroncio (Sr)	199	466	452	230	399	385	225	407	421	188	422	421	222	405	409	155	206	276	113	398	401	128	406	381
Zinc (Zn)	17	25	15	71	12	17	193	53	371	105	51	48	45	48	24	27	9	32	41	59	21	13	31	22
Litio (Li)	12	31	30	22	31	30	18	23	27	16	29	29	17	27	27	12	17	23	10	27	28	12	27	25
Cromo (Cr)	0,9	0,5	0,5	0,3	0,2	0,3	0,8	0,5	1,1	0,6	1,3	0,5	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,8	0,2	0,6	< LC	0,2	0,1	
Cobre (Cu)	4	2	7	3	1	2	7	2	30	12	2	2	3	1	1	2	2	3	18	10	9	1	2	1
Cobalto (Co)	0,3	0,7	0,6	0,8	0,5	0,5	1,1	0,5	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	1,0	0,8	0,7	0,2	0,4	0,4
Cadmio (Cd)	1,5	0,4	2,0	< LC	< LC	0,1	0,3	0,1	0,7	8,9	0,4	0,2	< LC	< LC	0,2	< LC	< LC	0,3	1,0	0,7	0,6	1,1	< LC	< LC
Manganeso (Mn)	3,1	46,1	24,8	65,9	44,3	66,5	40,9	65,8	108,0	42,9	86,2	101,0	27,9	62,5	86,3	18,0	10,9	13,8	55,1	61,3	80,2	13,2	49,2	54,8
Plomo (Pb)	1,0	2,7	0,5	0,8	0,2	0,3	3,9	1,7	9,3	4,0	0,9	0,9	0,4	0,2	0,2	0,8	0,4	0,9	14,1	9,9	7,9	0,4	0,5	0,4
Bario (Ba)	55	106	99	70	93	90	70	103	114	82	110	113	67	100	104	50	42	57	45	100	102	42	97	90
Niquel (Ni)	1,2	3,5	4,2	3,5	2,4	2,6	8,3	3,9	8,3	2,1	2,6	2,7	1,1	2,6	3,0	0,7	0,4	0,9	2,6	2,6	2,7	0,6	2,1	2,1
Vanadio (V)	20	76	74	59	88	78	56	68	69	44	68	69	51	67	69	35	31	39	27	53	54	26	66	62
Selenio (Se)	0,7	2,6	2,2	1,1	2,3	2,7	0,6	1,6	1,7	< LC	0,7	2,0	0,8	1,7	1,7	0,5	1,0	1,7	0,6	1,3	1,5	0,6	1,6	1,4
Arsenico (As)	18,1	35,7	34,3	48,0	41,1	37,8	33,5	36,1	36,6	27,7	31,4	34,5	33,2	36,0	36,3	25,4	19,9	25,9	26,3	31,2	31,8	23,4	32,6	31,1
Rubidio (Rb)	3,2	7,0	6,5	5,9	6,9	6,8	5,2	5,5	6,3	4,1	6,3	6,4	4,5	5,3	5,3	3,2	5,3	6,9	4,8	8,2	8,4	2,6	9,1	8,3

< LC: Menor al límite de cuantificación (LC). El LC es de $0,1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para todos los elementos a excepción del Al y Fe que es de $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$. En negrita se resaltan los valores que se muestran a modo informativo ya que exceden el rango de calibración del método.

Anexo 6. Control de etanol en AMD de bioensayo para evaluación de efectos en la actividad de Acetilcolinesterasa

Se realizó en bioensayos previos un control de etanol en AMD manteniendo los animales expuestos a una concentración de 5×10^{-4} % (v/v), equivalente a la presente en la solución de $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ CPF ensayada. Este control se realizó para evaluar el efecto sobre la actividad de AChE de la concentración de etanol utilizada como solvente. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en AMD, descartándose un efecto del solvente en estas condiciones (ver Tabla A6).

Tabla A6: Parámetros morfométricos Longitud total (L_T), Peso corporal (P_c) y Factor de condición (K), actividad de la enzima AChE (expresada como unidades de actividad específicas, U) y contenido de proteínas totales en homogenados de la fracción anterior de ejemplares de *C. decemmaculatus* de los grupos Control AMD y Control AMD-EtOH. Los valores se expresan como media \pm ESM.

Tratamiento	L_T (cm)	P_c (mg)	K	AChE (U)	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
Control AMD	$2,56 \pm 0,09$	97 ± 14	$0,56 \pm 0,02$	153 ± 4	46 ± 6
Control AMD-EtOH	$2,44 \pm 0,03$	89 ± 7	$0,60 \pm 0,03$	159 ± 12	46 ± 7

(Bernal-Rey *et al.*, 2017; Bernal-Rey, 2018).

Anexo 7. ANOVA de dos factores realizado para analizar las diferencias existentes en la actividad de acetilcolinesterasa entre las concentraciones ensayadas y los diferentes tiempos de recuperación (R1 y R2) con respecto al grupo de exposición (E).

ANOVA TwoWay (30/6/2020 17:38:53)

- Notes
- Input Data
- Descriptive Statistics
 - tiempo
 - Concentracion
 - Overall
 - Interaction
- ANOVA
 - Overall ANOVA
- Means Comparisons
 - Bonferroni Test
 - Tukey Test
 - tiempo
 - Concentracion
 - Sidak Test
 - Bonholt Test
 - Sidakholm Test

At the 0.05 level, the population means of **tiempo** are significantly different.
 At the 0.05 level, the population means of **Concentracion** are significantly different.
 At the 0.05 level, the interaction between **tiempo** and **Concentracion** is not significant.

Descriptive Statistics

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
(E)	27	219,51071	48,84421	9,40007	2385,75732	0	27
96 h (R1)	14	232,06625	23,99737	6,41357	575,87359	0	14
144 h (R2)	15	243,74202	18,23256	4,70763	332,4262	0	15

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
0	18	262,20802	23,61205	5,56541	557,52888	0	18
1	19	223,63416	29,2209	6,70373	853,86112	0	19
10	19	203,31861	35,13246	8,05994	1234,29006	0	19

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
	56	229,14012	38,13653	5,09621	1454,39464	0	56

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
(E)	0	263,91014	33,1422	11,0474	1098,40511	0	9
(E)	1	205,77581	32,58146	10,86049	1061,55178	0	9
(E)	10	188,84619	45,89064	15,29688	2105,95095	0	9
96 h (R1)	0	263,35139	5,1111	2,55555	26,12338	0	4
96 h (R1)	1	231,67666	9,60597	4,29592	92,27475	0	5
96 h (R1)	10	207,42775	4,68534	2,09535	21,95245	0	5
144 h (R2)	0	258,2295	11,20193	5,00965	125,48317	0	5
144 h (R2)	1	247,73671	10,11962	4,52563	102,40677	0	5
144 h (R2)	10	225,25985	15,04353	6,72767	226,30768	0	5

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tiempo	2	6035,13885	3017,56943	3,88784	0,02738
Concentracion	2	25341,33051	12670,66525	16,32489	4,13486E-6
Interaction	4	4516,22595	1129,05649	1,45468	0,23107
Model	8	43512,37275	5439,04659	7,00767	4,77776E-6
Error	47	36479,33218	776,156	--	--
Corrected Total	55	79991,70493	--	--	--

ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
tiempo	2	6035,13885	3017,56943	3,88784	0,02738
Concentracion	2	25341,33051	12670,66525	16,32489	4,13486E-6
Interaction	4	4516,22595	1129,05649	1,45468	0,23107
Model	8	43512,37275	5439,04659	7,00767	4,77776E-6
Error	47	36479,33218	776,156	--	--
Corrected Total	55	79991,70493	--	--	--

At the 0.05 level, the population means of **tiempo** are significantly different.
 At the 0.05 level, the population means of **Concentracion** are significantly different.
 At the 0.05 level, the interaction between **tiempo** and **Concentracion** is not significant.

Means Comparisons

Bonferroni Test

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
96 h (R1) (E)	12,55554	9,17531	1,93522	0,36548	0,05	0	-9,64947	34,76055
144 h (R2) (E)	24,23131	8,97164	3,81962	0,02549	0,05	1	2,51919	45,94342
144 h (R2) 96 h (R1)	11,67576	10,35294	1,59491	0,50201	0,05	0	-13,37923	36,73076

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
1 0	-38,57385	9,16352	5,95313	3,31894E-4	0,05	1	-60,75034	-16,39737
10 0	-58,8894	9,16352	9,08845	1,43109E-7	0,05	1	-81,06589	-36,71291
10 1	-20,31555	9,03884	3,17856	0,07362	0,05	0	-42,1903	1,5592

Sidak Test

Bonholt Test

Sidakholm Test

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Anexo 8. ANOVA de dos factores realizado para analizar las diferencias de susceptibilidad entre especies. Los factores analizados fueron las concentraciones ensayadas y las especies. Se analizó la actividad de AChE expresada tanto por mg de proteína como por mg de tejido húmedo.

Actividad de acetilcolinesterasa expresada por mg de proteína

ANOVA TwoWay (5/5/2021 15:50:46)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

concentracion

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
0	17	222,84324	62,38068	15,12954	3891,34904	0	17
1	18	132,68994	35,54978	8,37916	1263,78693	0	18
5	18	96,38335	28,52785	6,72408	813,83829	0	18

especie

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
Cnesterodon	28	158,34485	83,99652	15,87385	7055,41553	0	28
Gambusia	25	139,11994	45,42349	9,0847	2063,29313	0	25

Overall

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
	53	149,2765	68,62618	9,42653	4709,55249	0	53

ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
concentracion	2	147966,23235	73983,11618	39,38307	6,34772E-11
especie	1	5532,19139	5532,19139	2,94492	0,09246
Model	3	152847,70769	50949,2359	27,12155	1,75656E-10
Error	49	92049,02194	1878,55147	--	--
Corrected Total	52	244896,72962	--	--	--

At the 0.001 level, the population means of concentracion are significantly different.

At the 0.001 level, the population means of especie are significantly different.

Means Comparisons

Bonferroni Test

concentracion

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
1 0	-90,1533	14,65834	-6,15031	4,11716E-7	1E-3	1	-146,71728	-33,58932
5 0	-126,4599	14,65834	-8,62716	6,40203E-11	1E-3	1	-183,02388	-69,89592
5 1	-36,3066	14,44742	-2,51302	0,04593	1E-3	0	-92,05666	19,44347

especie

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Gambusia Cnesterodon	-19,22492	11,92616	-1,612	0,11339	1E-3	1	-60,97174	22,52191

Tukey Test

concentracion

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
1 0	-90,1533	14,65834	8,69785	3,74943E-7	1E-3	1	-146,51291	-33,7937
5 0	-126,4599	14,65834	12,20065	0	1E-3	1	-182,8195	-70,10029
5 1	-36,3066	14,44742	3,55394	0,03991	1E-3	0	-91,85523	19,24204

especie

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Gambusia Cnesterodon	-19,22492	11,92616	2,27971	0,11339	1E-3	1	-60,97331	22,52347

Sidak Test

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 1E-3 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 1E-3 level.

Actividad de acetilcolinesterasa expresada por mg de tejido húmedo

ANOVA TwoWay (30/6/2020 20:21:52)

- Notes
- Input Data
- Descriptive Statistics
 - concentracion

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
0	17	12.64441	4.58124	1.11111	20.98775	0	17
1	18	7.15069	1.84659	0.43525	3.4099	0	18
5	18	4.77944	2.23588	0.527	4.99916	0	18

 - especie

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
Cnesterodon	28	8.54429	5.53701	1.0464	30.65852	0	28
Gambusia	25	5.6183	2.9256	0.58512	8.55914	0	25

 - Overall

	N	Mean	SD	SEM	Variance	Missing	NonMissing
	53	8.1075	4.48185	0.61563	20.08701	0	53
- ANOVA
 - Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
concentracion	2	567.84199	283.92099	29.89557	3.26034E-9
especie	1	13.40038	13.40038	1.411	0.24062
Model	3	579.16679	193.0556	20.32786	1.07029E-8
Error	49	465.35751	9.49709	--	--
Corrected Total	52	1044.5243	--	--	--

At the 0.001 level, the population means of concentracion are significantly different.
 At the 0.001 level, the population means of especie are significantly different.
- Means Comparisons
 - Bonferroni Test
 - Tukey Test
 - concentracion

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
1 0	-5.49372	1.04224	7.4544	8.93796E-6	1E-3	1	-9.50102	-1.48642
5 0	-7.86497	1.04224	10.67194	0	1E-3	1	-11.87227	-3.85767
5 1	-2.37125	1.02725	3.26451	0.064	1E-3	0	-6.32089	1.57839

 - especie

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Gambusia Cnesterodon	-0.92599	0.84798	1.54431	0.28018	1E-3	1	-3.89439	2.04242
 - Sidak Test

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 1E-3 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 1E-3 level.

Anexo 9. Determinación de parámetros fisicoquímicos determinados en la estación hidrológica de Chascomús.

Tabla A3. Parámetros fisicoquímicos, cuantificación de plaguicidas y metales en muestras del agua superficial del estanque de la estación hidrológica de Chascomús lugar donde se colectaron los peces.

Parámetro FQ	Valor	Niveles guía* ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)
Temperatura de agua (T°C)	$21,3 \pm 1$	
Conductividad ($\mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$)	14670 ± 369	
Oxígeno Disuelto (mg O₂ × L⁻¹)	$12,94 \pm 0,01$	
pH	$8,35 \pm 0,05$	
Alcalinidad (mg CaCO₃ × L⁻¹)	682 ± 22	
Dureza (mg CaCO₃ × L⁻¹)	1318 ± 42	
Nitrito (mg N-NO₂ × L⁻¹)	$0,089 \pm 0,001$	60
Nitrato (mg N-NO₃ × L⁻¹)	$2,9 \pm 0,2$	
Amonio (mg N-NH₃ × L⁻¹)	$0,025 \pm 0,005$	1370
Fósforo inorgánico (mg PO₄³⁻ × L⁻¹)	$0,305 \pm 0,015$	
Turbidez NTU	$7,5 \pm 0,5$	
Cloruros (mg Cl⁻ × L⁻¹)	2067 ± 25	
Metales ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	Valor	Niveles guía* ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)
Aluminio	<0,5	5
Zinc	<0,5	30
Hierro	$80 \pm 0,2$	
Níquel	$0,18 \pm 0,03$	25
Cobre	<0,5	2
Cromo	$0,71 \pm 0,04$	2
Arsénico	$19,1 \pm 0,5$	50
Selenio	<0,5	1
Cadmio	<0,5	0,2
Plomo	0,5	1

(*) Niveles guía de calidad de agua para la protección de la vida acuática en agua superficial, Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina.

Bibliografía

- Abadi, D. R. V., Dobaradaran, S., Nabipour, I., Lamani, X., Ravanipour, M., Tahmasebi, R., y Nazmara, S. (2014). Comparative investigation of heavy metal, trace, and macro element contents in commercially valuable fish species harvested off from the Persian Gulf. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 6670-6678.
- Abel, P.D., (1996). *Water Pollution Biology*. Editorial CRC Press. Londres. 286 pp.
- Abele D., Vázquez-Medina J.P. y Zenteno-Savín T. (2012). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Wiley-Blackwell, UK. 548 pp.
- Aksoy, M., Ozaslan, M. S., y Kufrevioglu, O. I. (2016). Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(4), 546-550.
- Alarcón-Corredor, O. M. (2009). Los elementos traza. *Revista Médica de la extensión Portuguesa*, 4(3), 107-124.
- Alemadi, S. D., y Jenkins, D. G. (2008). Behavioral constraints for the spread of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki* (Poeciliidae). *Biological Invasions*, 10(1), 59-66.
- Altieri, M., y Pengue, W. (2006). GM soybean: Latin America's new colonizer. *Seedling*, 1, 13-17.
- Álvarez-Borrego, S. (2007). Principios generales del ciclo del carbono en el océano. Carbono en ecosistemas acuáticos de México. En: Hernández-de la Torre B, Gaxiola-Castro G (Eds.). *Carbono en ecosistemas acuáticos de México*. Instituto Nacional de Ecología México. 11-28 pp.
- Anderson, M. E. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological. In *Methods in enzymology*, 113, 548-555.
- Anguiano, O., Montagna, M., Ferrari, A., Soleño, J., Lascano, I., Loewy, R., Pechén de D'Angelo, A.M., y Magnarelli, G. (2011). *Clasificación y toxicología de los plaguicidas*. Educo (Editorial Universidad Nacional de Comahue). Número de publicación: 4145.
- Ansari, A. A., Singh, G. S., Lanza, G. R., y Rast, W. (Eds.). (2010). *Eutrophication: causes, consequences and control* (Vol. 1). Springer Science y Business Media 264 pp.
- Anzalone, A. (2008). *Herbicidas, Modos y Mecanismos de Acción en Plantas*. Fondo Editorial de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela. 67 pp.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., y Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in Surface and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93(9), 1866-1873.
- Aparicio, V., De Gerónimo, E., Guijarro, K. H., Perez, D., Portocarrero, R., y Vidal, C. (2015). *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*. INTA Ediciones, Argentina, 1-74.
- Aparicio, V. C., Costa, J. L., y Gonzalo Mayoral, E. S. (2017). *Plaguicidas en el ambiente*. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación. Primera edición. Ediciones INTA. 156 pp. https://mardelplata-conicet.gob.ar/wp-content/uploads/2018/03/inta_plaguicidas_en_el_ambiente_.pdf
- Appelo, C. A. J., y Postma, D. (2004). *Geochemistry, groundwater and pollution*. Segunda edición. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands. 683 pp.

Araújo, M. C., Assis, C. R. D., Silva, K. C. C., Souza, K. S., Azevedo, R. S., Alves, M. H. M. E., Silva L.C., Adam, M.L., Carvalho Junior, L.B., Bezerra, R. S., y Oliveira M.B.M. (2018). Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, 205, 213-226.

AIC y SGA. Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro y Secretaría de Gestión Ambiental. (1996). Propuesta de niveles guía de calidad para los Ríos Limay, Neuquén y Negro

Baudhuin P., Beaufay H., Rahman-Li Y., Sellinger O., Wattiaux R., Jacques P., y De Duve C. (1964). Tissue fractionation studies. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 92(1), 179.

Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., Núñez, A. A. G., Palacio, M. J., y Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of The Total Environment*, 650, 1779-1786.

Beauvais, S. L., Cole, K. J., Atchison, G. J., y Coffey, M. (2002). Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water, air, and soil pollution*, 135(1-4), 249-264.

Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J. L., Biellmann, D., Chatonnet, A., y Strähle, U. (2002). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature neuroscience*, 5(2), 111-118.

Berger, M., y Anderko, L. (2018). Pediatric Environmental Health Specialty Unit (PEHSU) National Network: Working Towards Environmental Health Equity. In APHA's 2018 Annual Meeting y Expo (Nov. 10-Nov. 14). American Public Health Association.

Bernal-Rey, D. L., dos Santos Afonso, M., y Menéndez-Helman, R. J. (2017). Effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity in two freshwater fish species (*Cnesterodon decemmaculatus* and *Gambusia affinis*). *International Journal of Environment and Health*, 8(4), 316-330.

Bernal-Rey, D.L. (2018). Exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* a clorpirifós y glifosato. Efectos sobre la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta. Tesis maestría en ciencias ambientales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Bernal-Rey, D. L., Cantera, C. G., dos Santos Afonso, M., y Menéndez-Helman, R. J. (2020). Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. *Ecotoxicology and environmental safety*, 187, 109673.

Berón, L. (1984). Evaluación de la calidad de las aguas de los ríos de la Plata y Matanza-Riachuelo mediante la utilización de índices de calidad de agua. Secretaría de Vivienda y Ordenamiento Ambiental. Ministerio de Salud y Acción Social, Argentina. 51 pp.

Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., y Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942.

Blanco, M. D. C., Paoloni, J. D., Morrás, H. J. M., Fiorentino, C. E., y Sequeira, M. (2006). Content and distribution of arsenic in soils, sediments and groundwater environments of the southern Pampa region, Argentina. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 21(6), 561-574.

- Blasco, F., Monteiro, D., Carvalho, C., y Rantin, F. (2021). Acute toxicity and effects of the Roundup Transorb®, a glyphosate-based herbicide, on freshwater teleost matrinxã, *Brycon amazonicus*. International Aquatic Research, 13(1), 17-28
- Bloomfield, M. M. (2002). Química de los organismos vivos. Editorial Limusa S.A. España. 512 pp.
- Bollmann, U. E., Tang, C., Eriksson, E., Jönsson, K., Vollertsen, J., y Bester, K. (2014). Biocides in urban wastewater treatment plant influent at dry and wet weather: concentrations, mass flows and possible sources. Water research, 60, 64-74.
- Bonansea, R. I., Marino, D. J., Bertrand, L., Wunderlin, D. A., y Amé, M. V. (2017). Tissue-specific bioconcentration and biotransformation of cypermethrin and chlorpyrifos in a native fish (*Jenynsia multidentata*) exposed to these insecticides singly and in mixtures. Environmental toxicology and chemistry, 36(7), 1764-1774.
- Bonifacio, A.F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M.L., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Bertrand, L., y Hued, A.C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to comercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. Ecological. Indicators. 67, 88-97.
- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Amé, M. V., y Hued, A. C. (2017). Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifod formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. Chemosphere, 188, 486-493.
- Boone, J.S. y Chambers, J.E. (1997). Biochemical factors contributing to toxicity differences among chlorpyrifos, parathion and methyl parathion in mosquitofish (*Gambusia affinis*). Aquatic Toxicology, 39(3), 333–343.
- Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuil, M., y Blanchoud, H. (2009). Transfer of glyphosate and its degrate AMPA to Surface waters through urban sewerage systems. Chemosphere, 77(1), 133-139.
- Bradbury, S.P., Carlson, R.W., Henry, T.R., Padilla, S., y Cowden, J. (2008). Toxic responses of the fish nervous system. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), The Toxicology of Fishes. CRC Press-Taylor y Francis Group, Boca Raton, Florida. 417–455 pp.
- Brooks, B.W., Riley, T.M., y Taylor, R.D. (2006). Water quality of effluent-dominated stream ecosystems: Ecotoxicological, hydrological, and management considerations. Hydrobiologia 556: 365-379.
- Cantera, C. G., Tufo, A. E., Scasso, R. A., y dos Santos Afonso, M. (2022). Geochemical characterization and the assessment of trace element retention in sediments of the Reconquista River, Argentina. Environmental Geochemistry and Health, 44(3), 729-747.
- Carod Benedico, E. (2002). Insecticidas organofosforados: " De la guerra química al riesgo laboral y doméstico". Medifam, 12(5), 51-62
- Carr, R. L., Ho, L. L., y Chambers, J. E. (1997). Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: biochemical mechanisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 16(11), 2369-2374.
- Carreño, L. V., y Viglizzo, E. F. (2007). Provisión de servicios ecológicos y gestión de los ambientes rurales en Argentina. Global Change Biology. 17(2), 959–973

Carriquiriborde, P. (2010). Toxicidad de glifosato en peces autóctonos: Estudios de laboratorio y campo. Taller de aspectos ambientales del uso de glifosato. INTA-EEA Balcarce, Argentina. 57-68 pp.

CASAFE (2014). Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Estudio de mercado de fitosanitarios 2013. <https://www.casafe.org/publicaciones/datos-del-mercado-argentino-de-fitosanitarios/>

Castañé, P. M., Rovedatti, M. G., Topalián, M. L., y Salibián, A. (2006). Spatial and temporal trends of physicochemical parameters in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Environmental monitoring and assessment*, 117(1), 135-144.

Castañé, P. M., Eissa, B. L., y Ossana, N. A. (2013). Respuesta de biomarcadores bioquímicos, morfológicos y comportamentales de la carpa común, *Cyprinus carpio*, por exposición a muestras ambientales. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(1), 41-47.

Castro Berman, M., Marino, D.J.G., Quiroga, M.V., y Zagarese, H., (2018). Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200, 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.103>

Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V. L., de Menezes, C. C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., y de Avila, L. A. (2011). Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 87(6), 597-602.

Chandrasekara, L. W. H. U., y Pathiratne.A. (2007). Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(1), 109-119.).

Chen, Z. F., Ying, G. G., Liu, Y. S., Zhang, Q. Q., Zhao, J. L., Liu, S. S., Chen, J., Peng, F. J., Lai, H. J., y Pan, C. G. (2014). Triclosan as a surrogate for household biocides: an investigation into biocides in aquatic environments of a highly urbanized region. *Water Research*, 58, 269-279.

Cochón, A. C., Della Penna, A. B., Kristoff, G., Piol, M. N., De Viale, L. S. M., y Guerrero, N. V. (2007). Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(2), 286-292.

Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., y Maceda-Veiga, A. (2016). Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment* 540, 307–323.

Cooke, M.S., Olinski, R. y Evans, M.D. (2006) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance?. *Clinica Chimica Acta* 365, 30-49.

Cosme, N., Koski, M., y Hauschild, M., (2015). Exposure factors for marine eutrophication impacts assessment based on a mechanistic biological model. *Ecol. Model.* 317: 50–63.

Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica chimica acta*, 366(1-2), 1-13.

Costanzo, S. D., Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., y Sandstrom, M. W. (2007). Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?. *Science of the Total Environment*, 384(1-3), 214-220

- Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Spanevello, R., Silveira, A., Ferreira Gonçalves, F., Zanella, R., y Loro, V. L. (2007). Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*, 67(11), 2305-2311.
- da Silva, R. S., de Paula Cognato, G., Vuaden, F. C., Rezende, M. F. S., Thiesen, F. V., da Graça Fauth, M., Reis Bogo, M., Bonan, C.D., y Dias, R. D. (2003). Different sensitivity of Ca²⁺-ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 135(2), 215-220.
- Dai, M.H., Guo, X.G., Zhai, W.D., Wang, B.W., Zuan, L.Y., Wang, L.F., Tang, T.T., y Cai, W.J. (2006) Oxygen depletion in the upper reach of the Pearl River estuary during a winter drought. *Marine Chemistry* 102:159–169. doi: 10.1016/j.marchem.2005.09.020
- Dautremepuys, C., Marcogliese, D.J., Gendron, A.D., y Dautremepuys, M.F., (2009). Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. *Science of The Total Environment*. 407, 1055–1064.
- de la Torre, F. R., Ferrari, L., y Salibián, A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 131(3), 271-280.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L. y Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina, *Chemosphere*, 59(4), 577–583.
- de la Torre, F.R., Salibian, A., y Ferrari, L. (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*. 68:1582–1590.
- de Moura, F. R., Brentegani, K. R., Gemelli, A., Sinhorin, A. P., y Sinhorin, V. D. G. (2017). Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. *Chemosphere*, 185: 445-451
- Deb, N. y Das, S., (2013). Toxicidad por clorpirifos en peces: una revisión. *Current World Environment. Medio ambiente mundial*. 8 (1), 77–84.
- Defensor del Pueblo de la Nación. (2007). Informe especial cuenca del río Reconquista. Primera parte. Defensor del Pueblo de la Nación. Buenos Aires, Argentina, 294 pp.
- Di Giulio, R.T., y Hinton, D.E. (Eds.). (2008) *The Toxicology of Fishes*. CRC Press-Taylor y Francis Group, Boca Raton, Florida. 417–455 pp.
- dos Santos Miron, D., Pretto, A., Crestani, M., Glusczak, L., Schetinger, M. R., Loro, V. L., y Morsch, V. M. (2008). Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, 74(1), 1-5.
- Durieux, V., y Gevenois, P. A. (2010). Bibliometric indicators: quality measurements of scientific publication. *Radiology*, 255(2), 342-351.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. y Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95
- Esquius, K. S., y Escalante, A. H. (2012). Periphyton assemblages and their relationships with environmental variables in a eutrophic shallow lake from Pampa Plain, Argentina.

Faccini, D., y Puricelli, E. (2007). Efficacy of herbicide dose and plant growth stage on weeds present in fallow ground. *Agriscentia*, 24(1), 29-35.

Falfushynska, H., Bodnar, O., Khatib, I., Kovalska, H., y Hulyk, S. (2021). Zebrafish as a suitable model for studying the mode of action and harmfulness of organophosphate pesticides. In E3S Web of Conferences (Vol. 280, 11005 pp.).

FAO y IWMI. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, International Water Management Institute. Sagasta, M.J., Zadeh, S. M., Turrall, H., y Burke, J. (2017). Water pollution from agriculture: a global review. Executive summary.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>

Fernández Cirelli, A. (2012). El agua: un recurso esencial. Química viva, Universidad de Buenos Aires Argentina. 11(3), 147-170.

Fernández, Cirelli., Cáceres, E. J., y Parodi, E. R. (2014). Phytoplankton Development in a highly eutrophic man-made lake from the Pampa plain of Argentina-a functional approach.

Farré, M., y Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 299-310.

Ferrari, L., García, M. E., de La Torre, F. R., y Demichelis, S. O. (1998). Evaluación ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 148, 1-16.

Ferrari, L. (2015). La ecotoxicología aplicada a la evaluación de la contaminación de los ríos: el caso del Río Reconquista. *Ciencia e Investigación* 65 (2), 17-37. (ISSN: 0009-6733).

Ferrari, L. Benítez, J., Ficella, M., Somma, A., Palacio, M., y Tripoli, L. (2017). Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. – Primera Edición. - Luján: EdUnLu, Libro digital, ISBN 978-987-3941-20-7. 48 pp.

Ferraro, G., Toranzo, R. M., Bagnato, C., Jousse, M. G., Areco, M. M., Bohé, A., Bagnarol, D., Pasquevich, D. M., y Curutchet, G. (2021). Native *Desmodesmus* sp. and *Chlorella* sp. isolated from the Reconquista River display a different binding preference for Cu (II) and Zn (II). *Journal of Environmental Management*, 293, 112835.

Ferro, J. P., Campos, L. B., Ossana, N. A., Ferrari, L., y Eissa, B. L. (2019). Effects of cadmium on the behaviour of *Cnesterodon decemmaculatus*. *International Journal of Environment and Health*, 9(4), 372-379.

Finkel, T., y Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.

Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22:241-253.

Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., y Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13010-13015.

- Fulton, M. H., y Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 37-45.
- Gabellone, N. A., Sarandón, R., y Claps, M. C. (2003). Caracterización y zonificación ecológica de la cuenca del río Salado. In *Inundaciones en la Región pampeana*/Maiola, Orlando C.; Gabellone, Néstor A.; Hernández, Mario Alberto.
- Gagneten, A. M. (2002). Efectos del herbicida paraquat sobre el zooplancton. *Iheringia. Série Zoologia*, 92(3), 47-56
- García, M. E., Demichelis, S. O., de la Torre, E. R., y Ferrari, L. (1998). Freshwater toxicity to *Cnesterodon* sp.: bioassays with water from the Reconquista River. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 26(3), 1216-1218.
- Gibbs, R. J. (1970). Mechanisms controlling world water chemistry. *Science*, 170: 1088-1090
- Gido, K. B., y Franssen, N. R. (2007). Invasion of stream fishes into low trophic positions. *Ecology of Freshwater Fish*, 16(3), 457-464.
- Giesy, J. P., Dobson, S., y Solomon, K. R. (2000): Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup ® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.
- Girotti, A. W., y Korytowski, W. (2016). Cholesterol as a natural probe for free radical-mediated lipid peroxidation in biological membranes and lipoproteins. *Journal of Chromatography B*, 1019, 202-209.
- Glassmeyer, S. T., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Cahill, J. D., Zaugg, S. D., Werner, S. L., Meyer. M.T. y Kryak, D. D. (2005). Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environmental science y technology*, 39(14), 5157-5169
- Glynn, J. H., Heinke, G. W., y García, H.J.E. (1999). *Ingeniería ambiental*. Editorial Pearson Educación. México. 778 pp.
- Glusczak, L, dos Santos Miron, D, Moraes, B. S., Simxes, R. R., Schetinger, M. R., Morsch, V. M., y Loro, V. L. (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol* 146:519–524.
- Gonzalez, M., Miglioranza, K. S., Aizpún, J. E., Isla, F. I., y Peña, A. (2010). Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). *Chemosphere*, 81(3), 351-358.
- Gómez, S. E. (1996). Resistenza alla temperatura e salinitá in pesci della Provincia di Buenos Aires (Argentina), con implicazioni zoogeografiche. In: *Acti*, 4, *Convegno Nazionale Assoc.* 171-192.
- Green, A. J., y Planchart, A. (2018). The neurological toxicity of heavy metals: A fish perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 208, 12-19.
- Gupta, R. C. (Ed.). (2007). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. Academic Press. Elsevier, Amsterdam. 763 pp.
- Gupta, R.C. (2014) *Biomarkers in Toxicology*. First Edition. Academic Press, Elsevier. Amsterdam, 1152 pp.

Gupta, R.C. (2019) Biomarkers in Toxicology. Second Edition. Academic Press, Elsevier. Amsterdam, 1152 pp.

Guimarães, A. T. B., De Assis, H. S., y Boeger, W. (2007). The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 68(1), 57-62.

Habig, W.H., Pabst, M.J., y Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139.

Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants—quo vadis?. Trends in pharmacological sciences, 32(3), 125-130.

Hamm, J. T., Wilson, B. W., y Hinton, D. E. (1998). Organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis *in vivo* in the teleost (*Oryzias latipes*). Neurotoxicology, 19, 853, 1998.

HRAC. Herbicide Resistance Action Committee (2022). https://hracglobal.com/files/HRAC_MOA_Poster_January_6_2022.pdf

Hasspieler, B. M., Behar, J. V., Carlson, D. B., Watson, D. E., y Di Giulio, R. T. (1994). Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*) to oxidative stress: a comparative study. Aquatic toxicology, 28(1-2), 53-64.

Heeb, F., Singer, H., Pernet-Coudrier, B., Qi, W., Liu, H., Longrée, P., Müller, B., y Berg, M. (2012). Organic micropollutants in rivers downstream of the megacity Beijing: sources and mass fluxes in a large-scale wastewater irrigation system. Environmental science y technology, 46(16), 8680-8688.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Functional metabolism: regulation and adaptation, 319-368. DOI:10.1002/047167558X.ch12

Herrero A.C. (2006). Desarrollo metodológico para el análisis del riesgo hídrico poblacional humano en cuencas periurbanas. Caso de estudio: Arroyo Las Catonas, Región Metropolitana de Buenos Aires. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Hilton J.' O'Hare M., Bowes M.J. y Jones J.I., (2006). How green is my river? A new paradigm of eutrophication in rivers. Science of the Total Environment 365:66-83.

Hong, Y., Yang, X., Huang, Y., Yan, G., y Cheng, Y. (2018). Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. Chemosphere, 210, 896-906.

Hued, A. C., y Bistoni, M. D. L. Á. (2005). Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. Hydrobiologia, 543(1), 279-298.

Huang, X., Cui, H., y Duan, W. (2020). Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 200, 110731.

Ibáñez, M., Picó, Y., y Manes, J. (1996). Influence of organic matter and surfactants on solid-phase extraction of diquat, paraquat and difenzoquat from waters. Journal of Chromatography A, 727(2), 245-252.

IGME. Instituto Geológico y Minero de España. López F. N. (1985). La composición química de las aguas subterráneas naturales. Editorial publicaciones IGME. Madrid. España. 156 pp.

INA. Instituto Nacional del Agua (2011). Menéndez, A. N., Lopolito, M. F., Badano, N., y Re, M. Evaluación de la calidad del agua en la Franja Costera Sur del Río de la Plata mediante modelación numérica. Informe LHA, 02-1207.

Infobae (2021). <https://www.infobae.com/america/ciencia-america/2021/08/18/estados-unidos-prohibira-el-clorpirifos-un-peligroso-pesticida-vinculado-al-dano-cerebral-en-los-ninos/>

IRAC. (2021). El Insecticide Resistance Action Committee. <http://www.irac-online.org/>

IRAM. (2008). Calidad ambiental, Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce, Método semiestático. Norma IRAM 29112. 24 pp.

Iummato, M. M., Sabatini, S. E., Cacciatore, L. C., Cochón, A. C., Cataldo, D., de Molina, M. D. C. R., y Juárez, Á. B. (2018). Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 163, 69-75.

Jeon, H. J., Lee, Y. H., Mo, H. H., Kim, M. J., Al-Wabel, M. I., Kim, Y., Cho, K., Kim, T-W., Ok, Y. S., y Lee, S. E. (2016). Chlorpyrifos-induced biomarkers in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1071-1080.

Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160.

Karami-Mohajeri, S., y Abdollahi, M. (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human y experimental toxicology*, 30(9), 1119-1140.

Kavitha, P., y Venkateswara Rao, J. (2007). Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 87 (2), 182–188.

Kavitha, P., y Venkateswara Rao, J. (2008). Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(2), 192-198.

Kilham, P. (1990). Mechanisms controlling the chemical composition of lakes and rivers: Data from Africa. *Limnology and Oceanography*, 35(1), 80-83.

Kim, J.-O., Antola, O., Spector, P.E., y Mueller, C. W. (1987). *Introduction to factor analysis: what it is and how to do it. Quantitative applications in the social sciences series*. Sage University Press, Newbury Park. 81 pp.

Köchling, T., Sanz, J. L., Galdino, L., Florencio, L., y Kato, M. T. (2017). Impacto f pollution on the microbial diversity of a tropical river in an urbanized régión of northeastern Brazil. *International microbiology*, 20(1), 11-24.

Kroon, F., Streten, C., y Harries, S. (2017). A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PloS one*, 12(4), e0174762.

Kunter, I., Zabib, N., y Kosar, M. (2019). A review of oxidants and antioxidants in biological systems. *EMU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 64-72.

Kwiatkowska, M., Nowacka-Krukowska, H., y Bukowska, B. (2014). The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(3), 1101-1108.

- Langerhans, R. B., Layman, C. A., Shokrollahi, A. M., y DeWitt, T. J. (2004). Predator-driven phenotypic diversification in *Gambusia affinis*. *Evolution*, 58(10), 2305-2318.
- Leaver, M.J., Clarke, D.J., y George, S.G. (1992). Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine Pleuronectid flatfish. *Aquatic Toxicology*, 22, 265-278
- Leguizamón A. (2014). Modifying Argentina: GM soy and socio-environmental change. *Geoforum* 53: 149-160.
- Linde-Arias, A. R., Inácio, A. F., Novo, L. A., de Alburquerque, C., y Moreira, J. C. (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental pollution*, 156(3), 974-979.
- Lima, P. L., Benassi, J. C., Pedrosa, R. C., Dal Magro, J., Oliveira, T. B., y Wilhelm Filho, D. (2006). Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(1), 23-30.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., y Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013, 1-8.
- Liu, R. X., Kuang, J., Gong, Q., y Hou, X. L. (2003). Principal component regression analysis with SPSS. *Computer methods and programs in biomedicine*, 71(2), 141-147.
- Lombardo, R. J., O'Farrell, I., y dos Santos Afonso, M. (2010). Spatial and temporal ion dynamics on a complex hydrological system: the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina). *Aquatic geochemistry*, 16(2), 293-309
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., y De Poorter, M. (2004). 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Primera edición. Grupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI). Auckland, Nueva Zelanda. 12 pp.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- LRPA. Ley N°24051 de Residuos Peligrosos de la Argentina. (1993). Decreto 831/93. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/10000-14999/12830/norma.htm>
- Lucinda, P. H. (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3, 259-270.
- Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.
- Ma, J., Liu, Y., Niu, D., y Li, X. (2013). Effects of chlorpyrifos on the transcription of CYP3A cDNA, activity of acetylcholinesterase, and oxidative stress response of goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental toxicology*, 30(4), 422-429.
- Machala, M., Petřivalský, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dušek, L., Piačka, V., y Svobodová, Z. (1997). Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants—a field study. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(7), 1410-1416.

- Maggioni, T., Hued, A. C., Monferrán, M. V., Bonansea, R. I., Galanti, L. N., y Amé, M. V. (2012). Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 63(3), 337-353.
- MAGyP (2020). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina. <http://datusestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- Maran, E., Fernández, M., Barbieri, P., Font, G., y Ruiz, M. J. (2009). Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(3), 922-930.
- Marbán, L., Giuffré, L., Ratto, S., y Agostini, A. (1999). Contaminación con metales pesados en un suelo de la cuenca del río Reconquista. *Ecología Austral*, 9(1-2), 15-19.
- Marino, D. y Ronco, A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the pampa ondulada, Argentina. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 75(4), 820-826.
- Mariño, E.E., y García, R.F. (2018). Apuntes sobre aplicaciones ambientales de la hidrogeoquímica. Secretaría de infraestructura y política hídrica consejo hídrico federal. Universidad Nacional de La Pampa. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 1-67 pp. <http://www.cohife.org/advf/documentos/2019/09/5d6eebe415ac8.pdf>
- Martínez, D. E., y Osterrieth, M. (2013). Hydrogeochemistry and pollution effects of an aquifer in quaternary loess like sediments in the landfilling area of Mar del Plata, Argentina. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (66), 9-23.
- Martínez-Morcillo, S., Pérez-López, M., Míguez, M. P., Valcárcel, Y., y Soler, F. (2019). Comparative study of esterase activities in different tissues of marine fish species *Trachurus trachurus*, *Merluccius merluccius* and *Trisopterus luscus*. *Science of The Total Environment*, 679, 12-22
- Mastrángelo, M., y Ferrari, L. (2013). *Cnesterodon decemmaculatus* juveniles as test organisms in toxicity assessment: cadmium case. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 91(1), 49-54
- Matthews, S., y Brand, K. (2005). El programa mundial sobre especies invasoras. Secretaría GISP. Primera Edición por la Secretaría GISP, 80 pp.
- Mdegela, R. H., Mosha, R. D., Sandvik, M., y Skaare, J. U. (2010). Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. *Ecotoxicology*, 19(5), 855-863.
- Menéndez, A., y Tarela, P. (2010). Transporte de contaminantes en el medio acuático. Universidad Tecnológica Nacional. Maestría en Ingeniería Ambiental. 123 pp.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., y Salibián, A. (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(1), 6-9.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M. y Salibián, A. (2015). Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 111, 236-241.
- Menni, R. C. (2004). Peces y ambientes en la Argentina continental. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales. Edición realizada por Estudio Sigma S.R.L. Buenos Aires, Argentina. 323 pp.

- Mikkelsen, C. A. (2008). La expansión de la soja y su relación con la agricultura industrial. *Revista Universitaria de Geografía*, 17, 165-188.
- Milagrosa O., Perales, J. A., Gravato, C., Guilhermino, L., y Galindo-Riaño, M. D. (2012). Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. *Marine pollution bulletin*, 64(10), 2097-2108.
- Miraglia M., Rivarola M., Benítez P., Flores M., y Reboratti L (2005). El uso de los SIG para la gestión ambiental en el conurbano bonaerense. VII Seminario nacional de la red de centros académicos para el estudio de gobiernos locales. Provincia de Mendoza, Argentina. 261 pp.
- Miretzky, P., Conzonno, V., y Fernández Cirelli, A. (2001). Geochemical mechanism controlling pampasic ponds hydrochemistry: Salado River drainage basin, Argentina. *Revista Brasileira Recursos Hídricos*, 6, 29-39.
- Modesto, K. A., y Martínez, C. B. (2010a). Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81(6), 781-787.
- Modesto, K. A., y Martínez, C. B. (2010b). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294-299.
- Molero, A. M., y Pisanó, A. (1987). Estadíos de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Revista Brasileira de Biología*, 47, 115-125.
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Amado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., y Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 146(1-2), 221-234.
- Monteiro, D. A., De Almeida, J. A., Rantin, F. T., y Kalinin, A. L. (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 143(2), 141-149.
- Moore, S. J., Lenglet, A. y N. Hill. (2006). Plant-based insect repellents. En *Insect Repellents: Principles Methods, and Use*. Boca Raton Florida: Editorial CRC Press, Debboun M, Frances SP, Strickman D, 275-303 pp.
- Moreira, S.M., y Guilhermino, L. (2005). The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione-S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese coast. *Environ Monit Assess* 105: 309-325
- Niera Gutiérrez M. (2006). Dureza en aguas de consumo humano y uso industrial, impactos y medidas de mitigación. Estudio de caso: Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Civil. Chile. 124 pp.
- Nieva, L. B., Flores, L., y Herrera, C. L. (2010). Composición de la dieta del pez introducido *Gambusia affinis* (Baird y Girard 1853) en cuerpos de agua permanentes vinculados al Río Juramento, Dpto. Metán, Salta, Argentina. *Ciencia*, 5, 13-26.
- Nonell, S., y Flors, C. (2016). Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences; Comprehensive series in photochemical y photobiological sciences; Royal society of chemistry: Cambridge, U.K., 2016(1), 684-692

Nunes, M. E., Müller, T. E., Murussi, C., do Amaral, A. M. B., Gomes, J. L., Marins, A. T., Leitemperger, J., Rodrigues, C. R., Fiúza, T. L., Costa, M. D., Severo E. S., Rosemberg, D. B., y Loro, V. L. (2018). Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish—a comparative study. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 206, 48-53.

O'Farrell I., Lombardo R., De Tezanos Pinto P. y Loez C., (2002). The assessment of water quality in the Lower Lujan River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays. Environmental Pollution 120(2):207-218

Okamoto, O. K., Pinto, E., Latorre, L. R., Bechara, E. J. H., y Colepicolo, P. (2001). Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 40(1), 18-24.

Oliveira, M. M., Silva Filho, M. V., Bastos, V. L. C., Fernandes, F. C., y Bastos, J. C. (2007). Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. Marine environmental research, 63(4), 303-312

OMS. Organización Mundial de la Salud (1993). Biomarkers and risk assessment concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. Ginebra, Suiza. 54 pp.

OMS. Organización Mundial de la Salud. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. Red, 114(2), 70134-8.

OMS. Organización Mundial de la Salud. (2010). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization. Stuttgart, Alemania. 78 pp.

Orjuela, H. B. (2018). El carbono orgánico del suelo y su papel frente al cambio climático. Revista de Ciencias Agrícolas, 35(1), 82-96.

Orozco Barrenetxea C., Perez Serrana A., Gonzalez Delgado M., Rodriguez Vidal F., y Alfayate Blanco J., (2003). "Contaminación Ambiental. Una Visión Desde la Química". Editorial Thomsom. Barcelona, 679 pp.

Orué, M. E., Laterra, P., y Cabria, F. (2007). Expansión de la frontera agrícola en Argentina y erosión hídrica: mapas de riesgo utilizando el modelo USLE con apoyo de SIG. Teledetección_Hacia—un mayor entendimiento de la dinámica global y regional. Editorial Martin, Mar del Plata. Argentina. 185-192 pp.

Ossana, N. A., Castaño, P. M., y Salibián, A. (2013). Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). Archives of environmental contamination and toxicology, 65(3), 486-497.

Ossana, N. A., Eissa, B. L., Baudou, F. G., Castaño, P. M., Soloneski, S., y Ferrari, L. (2016). Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. Ecotoxicology and Environmental Safety, 133, 73-81.

Ossana, N. A., Baudou, F. G., Castaño, P. M., Tripoli, L., Soloneski, S., y Ferrari, L. (2019). Histological, genotoxic, and biochemical effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, poeciliidae): early response bioassays to assess the impact of receiving waters. Journal of toxicology. Volumen 2019, Article ID 4687685, 13 pages.

Pandey, A.K., Nagpure, N.S., Trivedi, S.P., Kumar, R. y Kushwaha, B. (2011) Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. Mutation Research 726, 209-214.

PAN- UK (Pesticide Action Network UK). (1996). Paraquat. Pesticide News 32: 20- 21

Palanikumar, L., Kumaraguru, A. K., Ramakritinan, C. M., y Anand, M. (2014). Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. International Journal of Environmental Science and Technology, 11(3), 765-774.

Paracampo, A., Solis, M., Bonetto, C., y Mugni, H. (2014). Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. International journal of environmental health research, 25(1), 96-103.

Parvez, S., y Raisuddin, S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environmental Toxicology and Pharmacology, 20(1), 112-117.

Patlevič, P., Vašková, J., Švorc Jr, P., Vaško, L., y Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. Integrative Medicine Research, 5(4), 250-258.

Pérez, F. C. (2004). Efectos tóxicos a largo plazo de la exposición aguda a compuestos organofosforados. Alteraciones en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial (Vol. 175). Universidad Almería. España

Peruzzo, P. J., Porta, A. A., y Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. Environmental Pollution, 156(1), 61-66.

Pisoschi, A. M., y Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European journal of medicinal chemistry, 97, 55-74.

Peña, C. E., y Ayala-Fierro, D. E. (2007). Toxicología ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental.

Primavesi, A. (2002). Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais. Segunda edición. NBL Editora. Sao Paulo. 549 pp.

Primost, J. E., Marino, D. J., Aparicio, V. C., Costa, J. L., y Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. Environmental Pollution, 229, 771-779.

Potocko, A. (2017). Reconquista river basin in the metropolitan planning of Buenos Aires (Argentina). Scope, problems and proposals. Urbe-revista brasileira de gestao urbana, 9(3), 443-455.

Pretto, A., Loro, V. L., Morsch, V. M., Moraes, B. S., Menezes, C., Clasen, B., Hoehne, L., y Dressler, V. (2010). Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. Archives of environmental contamination and toxicology, 58(4), 1008-1014.

Quagliano, J. Witkiewicz, Z, y Popiel, S. (2009). Chemical warfare agents: TLC analysis. En J. Cazes (Ed), Encyclopedia of Chromatography. CRC Press, Florida, Estados Unidos: 403-407 pp.

Quirós, R., Rosso, J. J., Rennella, A., Sosnovsky, A., y Boveri, M. (2002). Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). Interciencia, 27(11), 584-591

Raiber, M., White, P. A., Daughney, C. J., Tschritter, C., Davidson, P., y Bainbridge, S. E. (2012). Three-dimensional geological modelling and multivariate statistical analysis of water chemistry

data to analyse and visualise aquifer structure and groundwater composition in the Wairau Plain, Marlborough District, New Zealand. *Journal of Hydrology*, 436, 13-34.

Raju, N. J. (2006). Seasonal evaluation of hydro-geochemical parameters using correlation and regression analysis. *Current Science*, 820-826.

Rao, J. V., Begum, G., Pallela, R., Usman, P. K., y Rao, R. N. (2005). Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. *International Journal of Environmental Research and public health*, 2(3), 478-483

Regoli, F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 50(4), 351-361.

Renau, A. (2010) Elementos minoritarios y traza en la masa de agua subterránea 080.021 (Plana de Castelló). Origen y procesos asociados. España: Universitat Jaume I, Departamento de Ciencias agrarias y del Medio Natural, Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas

Rendón-von Osten, J., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., y Soares, A. M. V. M. (2005). *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, 58(5), 627-636.

Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., y Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en Salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*. 16(2), 66-77

Reynoso, L., y Andriulo, A. (2013). Estado actual de la calidad del agua en la cuenca del arroyo pergamo. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. En línea https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-estado_actual_calidad_agua_cuenca_pergamino.pdf

Rigacci, L. N., Giorgi, A. D., Vilches, C. S., Ossana, N. A., y Salibián, A. (2013). Effect of a reservoir in the water quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. *Environmental monitoring and assessment*, 185(11), 9161-9168.

Ringuelet R.A., Aramburu R.H. y Alonso de Aramburu A. (1967). Los peces argentinos de agua dulce. Ediciones CIC Provincia de Buenos Aires.

Rodríguez Aguilar, B. A., Martínez Rivera, L. M., Peregrina Lucano, A. A., Ortiz Arrona, C. I., y Cárdenas Hernández, O. G. (2019). Analysis of pesticide residues in the surface water of the Ayuquila-Armeria River watershed, Mexico. *Terra Latinoamericana*, 37(2), 151-161.

Ronco, A. (2011). Impacto de Plaguicidas en ambientes acuáticos pampeanos: Integración de estudios químico ecotoxicológicos en experimentos de campo y laboratorio, con especial énfasis en el glifosato., INTA, Buenos Aires, 85-94 pp.

Ronco, A. E., Marino, D. J. G., Abelando, M., Almada, P., y Apartin, C. D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(8), 1-13.

Rosso, J. J., Troncoso, J. J., y Fernández-Cirelli, A. (2011). Geographic distribution of arsenic and trace metals in lotic ecosystems of the Pampa Plain, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 129–132.

- Rovedatti, M. G., Castañé, P. M., Topalián, M. L., y Salibián, A. (2001). Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Water Research*, 35(14), 3457-3461.
- Ruiz de Arcaute, C. (2018). Evaluación genotóxica y del daño oxidativo inducido en *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae) por herbicidas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Ruiz de Arcaute, C., Ossana, N. A., Pérez-Iglesias, J. M., Soloneski, S., y Larramendy, M. L. (2019). Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental science and pollution research*, 26(20), 20485-20498.
- Ruiz, M. J., López-Jaramillo, L., Redondo, M. J., y Font, G. (1997). Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: application to environmental samples. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 59(4), 619-625.
- Ruvinda, S. M., y Pathiratne, A. (2018). Biomarker responses of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to polluted water from Kelani river basin, Sri Lanka: Implications for biomonitoring river pollution. *Sri Lanka J. Aquat. Sci*, 23(1), 105-117.
- Sainato, C., Galindo, G., Pomposiello, C., Malleville, H., de Abelleira, D., y Losinno, B. (2003). Electrical conductivity and depth of groundwater at the Pergamino zone (Buenos Aires Province, Argentina) through vertical electrical soundings and geostatistical analysis. *Journal of South American Earth Sciences*, 16(2), 177-186.
- Salibián, A. (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 35-65.
- Sanchez, W., y Porcher, J. M. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(2), 150-158.
- Sande Fouz, P., Mirás-Avalos, J. M., Vidal Vázquez, E., y Paz González, A. (2005). Formas de fósforo y su relación con la erosión en aguas superficiales bajo clima atlántico. Facultad de Ciencias. Universidad de A. Coruña. A. Zapateira s/n 15071. A. Coruña. Escuela potécnica Superior de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. 27002. Lugo. 7(2), 125-130.
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. D. M. G., y da Rosa, C. E. (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: *In vitro* studies. *Aquatic Toxicology*, 130, 171-173.
- Satorre, E. H. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia hoy*, 15(87), 24-31.
- Sawyer, C., McCarty, P., y Parkin, G. (2001). Química para Ingeniería Ambiental. Cuarta Edición. McGraw Hill. Bogotá, 716 pp.
- Scarcia, P., Calamante, G., y de la Torre, F. (2014). Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Luján river (Argentina). *Environmental toxicology*, 29(5), 545-557.
- Schäfer, R.B., Brink, P.J. Van Den, y Liess, M. (2011). Chapter 6: Impacts of Pesticides on Freshwater Ecosystems. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. 2011, 111–137.

Schenone, N., Volpedo, A., y Fernández Cirelli, A. (2008). Estado trófico y variación estacional de nutrientes en los ríos y canales del humedal mixo-halino de Bahía Samborombón (Argentina) A. limnetica, 27(1), 143-150.

Schlenk, D. (2005). Pesticide biotransformation in fish. In Biochemistry and molecular biology of fishes. Editorial Elsevier, 6, 171-190.

Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M., y Benson, W. (2008). Biomarkers, In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), The Toxicology of Fishes. CRC Press-Taylor y Francis Group, Boca Raton, Florida. 417–455 pp.

Schuliga, M., Chouchane, S., y Snow, E.T. (2002). Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic. Toxicological Sciences. 70, 183–192

SENASA (2021). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución 414/2021. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/247780/20210806>

Septory, R., y Triyatmo, B. (2016). The utilization of aquacultures wastewater as nutrient sources in *Nannochloropsis oculata* cultivation to prevent waters contamination in coastal area. En: Advances of science and technology for society: Proceedings of the 1st International Conference on Science and Technology 2015 (ICST-2015). AIP Publishing. <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.4958479>

Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., y Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. Environmental research, 137, 246-255.

Shahbaa, K, AL-Taee., Karam H, Al-Mallah., y Hana Kh, Ismai. (2020). Review on some heavy metals toxicity on freshwater fishes. Journal of Applied Veterinary Sciences, 5(3), 78-86.

Sharbidre, A. A., Metkari, V., y Patode, P. (2011). Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 101(2), 132-141.

Sharma, M., Chadha, P., y Sharma, R. (2021). Environmental biomonitoring using different biomarkers and their contribution in aquatic environmental research. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 9(5): 205-214. <https://doi.org/10.22271/fish.2021.v9.i5c.2570>

Sies, H., Berndt, C., y Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. Annual review of biochemistry, 86, 715-748.

Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., dos Santos Teixeira, J. M., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M., y Loro, V. L. (2014). Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp*). Ecotoxicology and environmental safety, 106, 181-187.

Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., y Svobodova, Z. (2009). A reviews: Oxidative stress in fish induced by pesticides. Neuroendocrinology Letters, 30(1), 2.

Smith, V. H. y Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here? Trends in Ecology y Evolution. 24 (4): 201-207.

Smolders, R., Bervoets, L., y De Boeck, G. (2002). Integrated condition indices as measure of whole effluent toxicity in zebra fish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry 21:87–93.

- Smolders, R., Bervoets, L., y Blust, R. (2004). In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*, 132(2), 231-243.
- Soetaert, K., Hofmann, A. F., Middelburg, J. J., Meysman, F. J., y Greenwood, J. (2007). Reprint of "The effect of biogeochemical processes on pH". *Marine Chemistry*, 106(1-2), 380-401
- Solomon, K. R., y Sibley, P. (2002). New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here?. *Marine Pollution Bulletin*, 44(4), 279-285.
- Souza Casadinho, J. (2009). La problemática del uso de plaguicidas en argentina. Modelos productivos e impacto en el ambiente. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América latina RAPAL [en línea] http://www.rap-al.org/articulos_files/Plaguicidas_Argentina.pdf, 15(4), 2013.
- Spence A., Simpson A.J., McNally D.J., Moran B.W., Mc-Caul M.V., Hart K., Paull B. y Kelleher B.P. (2011). The degradation characteristics of microbial biomass in soil. *Geochimica et Cosmochimical Acta* 75, 2571-2581.
- SRHN. Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación (2005). Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente. República Argentina.43 pp.
- Stara, A., Machova, J., y Velisek, J., (2012). Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Environmenta Toxicology and Pharmacology*. 33, 334-343
- Straskraba, M., y Tundisi, J.G. (1999) Reservoir Water Quality Management, International Lake Enviroment Committee, Editorial Copyright. Japan. 301 pp.
- Stoliar, O. B., y Lushchak, V. I. (2012). Environmental pollution and oxidative stress in fish. Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants, 131-166
- Sun, H. Q., Du, Y., Zhang, Z. Y., Jiang, W. J., Guo, Y. M., Lu, X. W., Zhang, Y. M., y Sun, L. W. (2016). Acute toxicity and ecological risk assessment of benzophenone and N, N-diethyl-3 methylbenzamide in personal care products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 925
- Stumm, W., y Morgan, J. J. (1996). Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural Waters. Tercera Edición. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1040 pp.
- Talabi, A. O., y Kayode, T. J. (2019). Groundwater Pollution and Remediation. *Journal of Water Resource and Protection*, 11(1), 1-19.
- Tang, J.; Cao, Y.; Rose, R.L.; Brimfield, A.A.; Dai, D.; Goldstein, J.A. y Hodgson, E. (2001). Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 29: 1201-1204.
- Tauber, F., Martino, H., Sánchez Arrabal, M. B., y Resa, S. (2011). Convenio de Cooperación Técnica: Plan particularizado de ordenamiento urbano y reconfiguración territorial para las márgenes de la cuenca del río Reconquista. Informe final. Consejo Federal de inversiones. Universidad Nacional de La Plata
- Teichberg, M., Fox, S. E., Olsen, Y. S., Valiela, I., Martinetto, P., Iribarne, O., Muto, E. Y., Petti, M. A., Corbisier, T. N., Soto-Jiménez, M., Páez-Osuna, Federico., Castro, P., Freitas, H., Zitelli, A., Cardinaletti, Massino., y Tagliapietra, D. (2010). Eutrophication and macroalgal blooms in temperate and tropical coastal waters: nutrient enrichment experiments with *Ulva* spp. *Global Change Biology*, 16(9), 2624-2637.

- Terry Jr. AV. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology and Therapeutics*, 134(3), 355-365.
- Timbrell, J.A. (2009). Toxic responses to foreign compounds. In: *Principles of biochemical toxicology*. CRC Press. Healthcare, New York, 193-292 pp.
- Timm, J. (2004). Variabilidad climática y cambios en el uso de la tierra en la Región Pampeana Argentina. Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. 42 pp.
- Thompson H.M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8, 369-384.
- Tripathi, M., y Singal, S. K. (2019). Use of Principal Component Analysis for parameter selection for development of a novel Water Quality Index: A case study of river Ganga India. *Ecological Indicators*, 96, 430-436.
- US EPA - Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. (1987). *Health Advisory Draft Report: Paraquat*. Office of Drinking Water, Washington, DC, 1987.10-1 12
- US EPA - Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. (1993). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Fresh Water and Marine Organisms*. U.S.EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C. 35 pp.
- Van der Oost R, Beyer J, y Vermeulen N. P. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13:57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Dyk, J. S., y Pletschke, B. (2011). Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 82(3), 291-307
- Varó I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, Lopez FJ, y Navarro JC. (2000). Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanus iberus* (Pisces). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65:623–630
- Venkateswara Rao, J., Rani, C. H. S., Kavitha, P., Rao, R. N., y Madhavendra, S. S. (2003). Toxicity of chlorpyrifos to the fish *Oreochromis mossambicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(5), 985-992.
- Venkateswara Rao, J., Begum, G., Pallela, R., Usman, P. y Rao, R. N. (2005). Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(3), 478-483.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S., y Larramendy, M. L. (2013). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 166-173.
- Vidal, N., Loureiro, M., Hued, A. C., Eguren, G., y de Mello, F. T. (2018). Female masculinization and reproductive success in *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiforme: Poeciliidae) under anthropogenic impact. *Ecotoxicology*, 27(10), 1331-1340.
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Caldas, S. S., Tesser, M. E., Risso, W. E., Escarrone, A. L. V., Primel, E. G., Bianchini, A., y dos Reis Martinez, C. B. (2019). An integrated approach in subtropical agro-

ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. *Science of the Total Environment*, 666, 508-524

Vittozzi, L., Fabrizi, L., Di Consiglio, E., y Testai, E. (2001). Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environment International*, 26(3): 125-129.

Volante, J., Mosciaro, J., Morales Poclava, M., Vale, L., Castrillo, S., Sawchik, J., Tiscornia, G., Fuente, M., Maldonado, I., Vega, A., Trujillo, R., Cortez, L., y Paruelo, J., (2015). Expansión agrícola en Argentina, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Chile entre 2000-2010. Caracterización espacial mediante series temporales de índices de vegetación. *Revista de investigaciones agropecuarias*. 41, 179– 190.

Volpedo, A., y Fernandez Cirelli, A. (2013). El Lago Chasicó: similitudes y diferencias con las lagunas pampásicas. *Revistas Universidad de la Plata*. 5(1), 1-18.

Wang, X., Lu, Q., Guo, J., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, Xu., Anadón, Arturo., y Martínez, M. A. (2022). Oxidative Stress and Metabolism: A Mechanistic Insight for Glyphosate Toxicology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 62, 617-639.

Webster, T. M. U., y Santos, E. M. (2015). Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, 16(1), 1-14.

Wetzel R.G. (1982). Limnología. Editorial Omega. Barcelona, España: 679 pp.

Wieczerzak, M., Namieśnik, J., y Kudłak, B. (2016). Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. *Environment international*, 94, 341-361.

Wills, E. D. (1987). Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford-Washington USA. 127-152 pp.

Winkler, M., (1995). "Tratamiento Biológico de Aguas de Desecho". Editorial Limusa. México D.F. 338 pp.

Wunderlin, D.A., Diaz, M., Ame, M.V., Pesce, S.V., Hued, A.C. y Bistoni, M., (2001). Pattern Recognition Techniques for the Evaluation of Spatial and Temporal Variations in Water Quality. A Case Study: Suquía River Basin (Córdoba–Argentina). *Water research*, 35(12), 2881-2894.

Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., y Wang, X. (2012). Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 74-80.

Zarrilli, A. (2020). La Naturaleza puesta en Jaque: La Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Socio-Ambiental (1980-2017). *Historia Ambiental Latinoamericana y Caribeña (HALAC) revista de la Solcha*, 10(1), 125-149.

Zeitoun, M. M., y Mehana, E. E. (2014). Impact of water pollution with heavy metals on fish health: overview and updates. *Global Veterinaria*, 12(2), 219-231.

Zhang, J. F., Wang, X. R., Guo, H. Y., Wu, J. C., y Xue, Y. Q. (2004). Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1), 110-116.

Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., Xu, P., y Yin, G. (2021). Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidative status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis*

niloticus). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology, 239, 108878.

Zimmerman, G., y Soreq, H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. Cell and tissue research, 326(2), 655-669.